

# Mastergradsoppgave i Molekylær biovitenskap studieretning molekylærbiologi

**Inger Louise Bones**

Etablering av en eksperimentell plattform for  
identifisering av nødvendige og tilstrekkelige  
komponenter i teratocarcinoma NCCIT celleekstrakt for  
transkripsjonell reprogrammering av 293T celler

Omfang: 60 studiepoeng

**Institutt for molekylær biovitenskap**  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
**UNIVERSITETET I OSLO 06/2006**



## FORORD

Denne mastergradsoppgaven ble utført ved Institutt for medisinske basalfag, Universitetet i Oslo. Dette siste året har vært en fantastisk utfordrende tid med både opp- og nedturer som har ført til at jeg har lært utrolig mye, både faglig og om meg selv. Jeg vil rette en stor takk til min veileder professor Jan Øivind Moskaug for veiledning og hjelp med gjennomføring av det praktiske arbeidet. I tillegg har han vært til uvurderlig hjelp i mine første forsøk på å uttrykke meg på en vitenskapelig måte. Jeg må særlig takke professor Philippe Collas som har latt meg få bruke hans resurser, metoder og ideer i denne oppgaven. Takker også min internveileder Kristian Prydz ved Institutt for Molekylær Biovitenskap, Universitetet i Oslo. Videre vil jeg rette en takk til alle tilknyttet Philippe Collas gruppe, men spesielt til Christel som har svart på mine uendelige mange spørsmål om reprogrammering, Agate for transfekterte EGFP-293T celler og Thomas for hjelp med konfokal mikroskopi. I tillegg fortjener medstudent Sanna en varm takk for støtte, oppmuntring, faglige og ikke fullt så faglige diskusjoner. Til sist vil jeg takke min kjære Torleif og min familie som har en slik urokkelig tro på meg. Uten deres støtte vet jeg ikke hva jeg skulle gjort. Tusen takk!

Oslo, juni 2006

Inger Louise Bones

## INNHALDSFORTEGNELSE

Forord .....	1
Innholdsfortegnelse .....	2
Forkortelser .....	3
Sammendrag.....	5
Innledning.....	6
Stamceller.....	7
Naturlig plastisitet .....	11
Eksperimentelt induisert plastisitet .....	13
Målsetning.....	18
Materialer og metoder .....	19
Celler .....	19
Ekstraktpreparering .....	19
Permeabilisering av plasmamembranen med Streptolysin O (SLO) .....	21
Inkubering med markør eller ekstrakt .....	22
Mikroskopering .....	23
Genekspresjonsanalyser .....	23
Fraksjonering.....	26
Elektroforese .....	26
Resultater.....	28
Etablering av en multibrønnplate plattform .....	28
Reprogrammering av adherente celler med NCCIT ekstrakt.....	37
Etablering av en fraksjoneringsmetode kompatibel med reprogrammering .....	40
Diskusjon.....	44
Effekt av adherens og SLO permeabilisering på opptak av markører .....	44
Effekt av adherens og SLO permeabilisering på reprogrammering.....	47
Fraksjonering av ekstraktet .....	50
Konklusjon .....	51
Referanseliste.....	52
Supplerende tabell og figurer .....	59

## FORKORTELSER

ATCC	“American Type Culture Collection”
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serum albumin
cDNA	Komplementær DNA
CK	Kreatine kinase
CLB	Cellelyseringsbuffer
Ct	Terskelverdi
CTP	Cytidintrifosfat
dH <sub>2</sub> O	Destillert vann
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DTT	Ditiotreitol
EG	Embryonale kimceller
EGFP	”Enhanced green fluorescent protein”
EtBr	Etidiumbromid
GFP	”Green fluorescent protein”
GPI	Glycosylfosfatidylinositol
GTP	Guanosintrifosfat
HEPES	N-[2-Hydroksyetyl]piperazin-N’-[2-etansvovelsyre]
HBSS	“Hank’s Balanced Salt Solution”
H3	Histon 3
H3K9	Lysin 9 til histon 3
H4	Histon 4
KDa	Kilo Dalton
MQ H <sub>2</sub> O	Milli-Q vann
mRNA	Budbringer RNA
NTP	Nukleotidtrifosfat
PBS	Fosfatbufret saltløsning
PC	Fosfokreatin
PMSF	Fenylmetylsulfonylfluorid
QRT-PCR	Kvantitativ RT-PCR
RNA	Ribonukleinsyre
RT	Romtemperatur
RT-PCR	Revers transkriptase polymerase kjedereaksjon
siRNA	”Small interference” RNA
SDS-PAGE	SDS-Polyakrylamid gel elektroforese
SLO	Streptolysin O
SUMO	”Small ubiquitin-related modifier”
TCA	Triklor-eddikksyre
UTP	Uridintrifosfat
UV	Ultrafiolett stråling
v/v	vektvolum

## Celler og cellelinjer

EC	Embryonale carcinoma
ES	Embryonale stamceller
MRL	Healer MRL mus
INS-1E	Rotte insulinoma cellelinje INS-IE
Jurkat T	Human T-lymfocyt cellelinje
NCCIT	Embryonale carcinoma celler
U-937	Monocyt cellelinje U-937
293T	Human nyre epitel cellelinje
293T-EGFP	293T celler transfektert med plasmid pEGFP-N1

## Gen navn

APL	Alkalinfosfatase
FGF4	Fibroblast vekstfaktor 4
FOXD3	“Forkhead box protein D3”
GAPDH	Glyceraldehyd 3 fosfatedehydrogenase
GCAP	”Germ cell alkaline phosphatase”
LMNA	LaminA
NANOG	Nanog homeobox
NPR1	“Natriuretic peptide receptor A”
NPR3	“Natriuretic peptide receptor C”
Oct4	Octamer bindende transkripsjonsfaktor 4
OPN	Osteopontin
PDX1	Bukspyttkjertel spesifikt gen
POU	Pit-1, Oct-1 og 2, Unc86 transkripsjonsfaktorer
POU 5fl	Oct4
REX1	Zink finger protein 42
SOX2	Transkripsjonsfaktor SOX2
THY1	Differensieringsmarkør
UTF1	Udifferensiert embryonalcelle transkripsjonsfaktor 1

## SAMMENDRAG

Denne mastergradsoppgaven beskriver etablering en eksperimentell plattform for identifisering av nødvendige og tilstrekkelige komponenter i teratocarcinoma NCCIT celleekstrakt for reprogrammering av 293T celler. Identifikasjon av komponenter i komplekse ekstrakter involvert i reprogrammering *in vitro* krever et oppsett som tillater analyse av et større antall reaksjoner enn det eksisterende oppsett gjør. Derfor har jeg etablert et oppsett hvor celler behandles med ekstrakter og ekstraktfraksjoner mens de vokser adherent til en poly-L-lysin behandlet glassoverflate. Basert på målinger av EGFP og dextran konjugater som markører synes opptak av makromolekyler med potensiell reprogrammeringsaktivitet under disse betingelsene å være omfattende. Dette opptaket er nødvendigvis ikke avhengig av permeabilisering av cellemembranen med SLO. Jeg har også etablert en metode for fraksjonering av et komplekst totalekstrakt fra celler. Denne metoden gir tilfredsstillende separasjon av makromolekyler og tilstrekkelig fysiologiske betingelser for initielle forsøk på identifisere komponenter som er ansvarlig for reprogrammering av celler.

## INNLEDNING

I en multicellulær organisme kommer hver eneste cellekjerne fra en enkelt kjerne i det befruktede egget. Det befruktede egget refereres til som totipotent siden det i tillegg til morkaken, gir opphav til alle de tre primære kimlagene; endoderm, mesoderm og ektoderm som differensierer til alle slags celler og vev i kroppen. Differensiering er en nøye regulert prosess hvor celler blir spesialisert til å utføre spesifikke funksjoner, mens de mister evnen til å utføre andre. Under den embryonale utviklingen er det første synlige tegn på differensiering dannelsen av blastocysten. En indre klump med celler, den indre cellemassen, defineres som pluripotent siden den kan gi opphav til de tre kimlagene, men ikke alene danne et levedyktig foster. Det endoderme laget gir til eksempel opphav til de fleste epitelcellene i fordøyelsessystemet og tilhørende kjertler, mens det mesoderme laget gir opphav til blant annet muskler og blodceller. Videre blir til eksempel hud og neuroner dannet fra det ektoderme laget. Celler blir med andre ord både strukturelt og funksjonelt forskjellige fra hverandre etter hvert som de differensierer.

Forskjellene skyldes epigenetiske modifiseringer som er arvelige, men potensielt reversible forandringer i genekspresjonen uten å endre DNA sekvensen. Det er identifisert to hovedtyper av epigenetiske modifiseringer; DNA metylering og histon modifisering<sup>1</sup>. DNA metylering er en postreplikativ prosess hvor cytosin residier i CpG sekvenser blir metylert<sup>2</sup>. DNA metylering på en gitt promotor er som regel assosiert med redusert transkripsjon<sup>3</sup>.

Husholdningsgener har CpG-rike øyer ved promoterregionene som er umetylert i de fleste celletyper. I motsetning er vevsspesifikke gener metylert i de fleste vev bortsett fra vevet hvor genet blir uttrykt. Dette tyder på at metyleringsmønsteret har sammenheng med genekspresjonen.

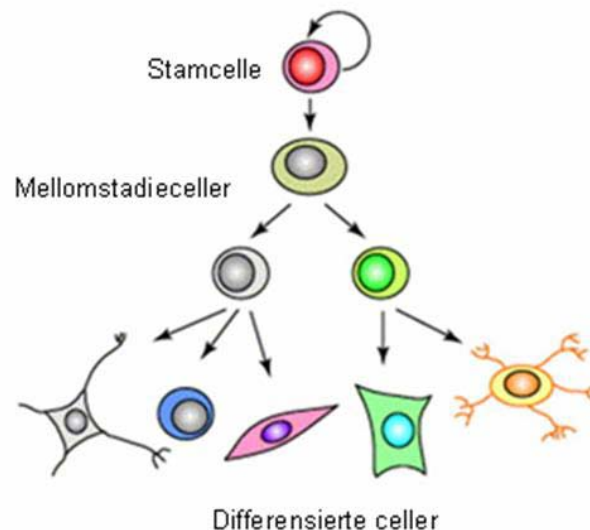
Histon modifisering fører til endring av kromosomstrukturen og også dermed genekspresjonen. Histon modifiseringer involverer metylering, acetylering, ubiquitinerings og sumolering av lysin residier og fosforylering av serin residier i N-terminale ende av fortrinnsvis histon H3 og H4. Mange av disse histon modifiseringene fungerer i kombinasjon, noe som har ført til histonkodehypotesen<sup>4</sup> som bidrar med et tilleggssnivå av regulering av transkripsjon av et gen.

Etter hvert som utvikling og differensiering fortsetter, blir gener som koder for cellelinjespesifikke markører oppregulert eller skrudd på. Tilsvarende blir gener som koder for pluripotens nedregulert eller skrudd av. Siden epigenetiske modifiseringer er arvelige, antas det at de overfører molekylær hukommelse til cellen etter hvert som den deles.

## **Stamceller**

Det vil til enhver tid være celler i kroppen vår som dør og som må bli erstattet av nye celler. Cellene som er ansvarlig for å produsere disse nye cellene heter stamceller. En stamcelle defineres ut fra to fundamentale kriterier. Det første kriteriet er at de er uspesialiserte, selvfornyende celler som ved celledeling gir opphav til datterceller med samme karakteristiske trekk som modercellen. Det andre kriteriet er at de i tillegg kan undergå asymmetrisk celledeling og dermed produsere mellomstadieceller som videre gir opphav til spesialiserte celler (figur 1). Stamceller kan deles inn i to grupper; embryonale eller somatiske, ut fra deres opphav. Embryonale stamceller (ES celler) er pluripotente celler derivert fra den indre cellemassen i en 4-5 dager gammel human blastocyst<sup>5</sup>, og kan dermed per definisjon kun eksistere *in vitro*. Stamceller som har opphav i ferdig utviklet vev refereres ofte til som adulte- eller somatiske stamceller. Somatisk refererer til alle kroppens celler bortsett fra kjønnscellene. Disse stamcellene regnes for å ha et mer begrenset differensieringspotensiale enn ES celler, siden det ikke er vist at de kan differensiere til like mange celletyper.





**Figur 1. Definisjon på en stamcelle.** Stamceller er selvfornyende, og kan i tillegg undergå asymmetrisk celledeling og dermed produsere mer forpliktete celler som videre gir opphav til spesialiserte celler. (Figur er modifisert fra Collas 2003)

### Somatiske stamceller

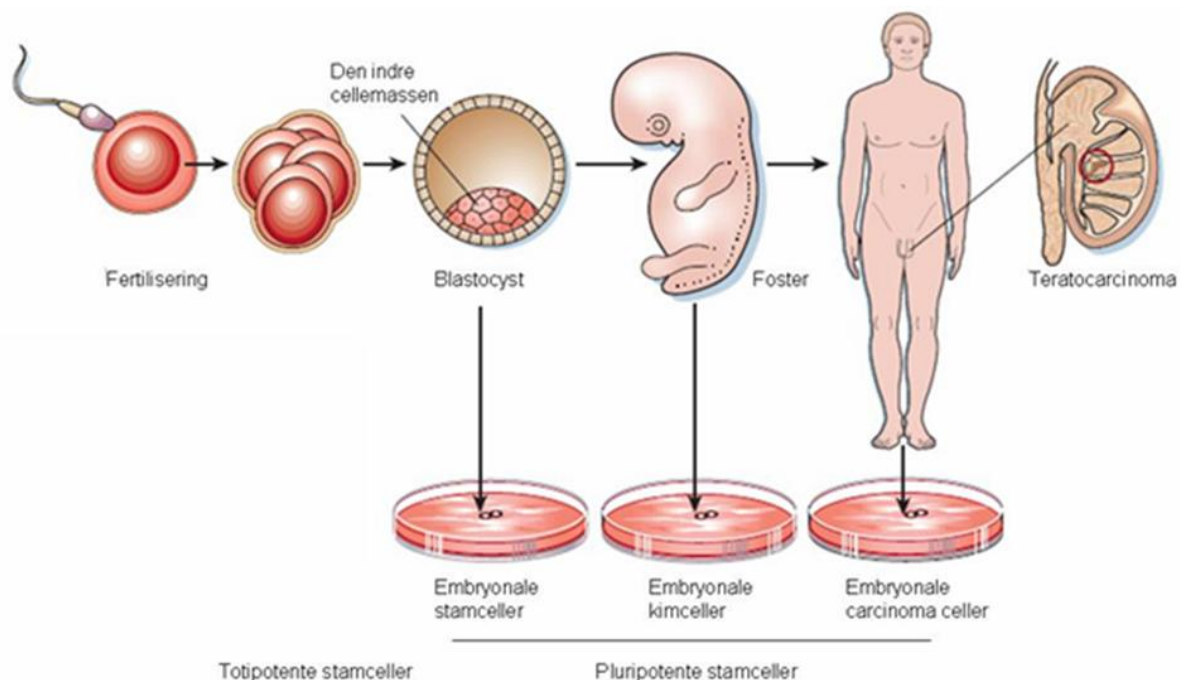
Somatiske stamceller finnes i mange vev inkludert blod, fettvev og skjelettmuskler. Disse stamcellene sørger for å regenerere skadet vev og vedlikeholde vevshomeostase.

Differensieringspotensialet til de adulte stamcellene har vært antatt å være begrenset til det vevet de befinner seg i, men senere forskning har vist at adulte stamceller også kan differensiere til et stort antall forskjellige celletyper og vev. Stamceller fra fettvev kan differensiere i retning av nevronale, -chondrogene, -myogene eller osteogene celler *in vitro*<sup>6,7</sup>, og bidra med regenerering av skadet benvev *in vivo*<sup>8</sup>. Dette tyder på at somatiske stamceller, i hvert fall i noen eksperimentelle situasjoner, innehar en tilstrekkelig plastisitet til å differensiere til andre celletyper enn deres forutsagte utviklingslinje, og også krysse kimlagsgrensen. Somatiske stamceller har med andre ord en større plastisitet enn tidligere antatt.

### Embryonale stamceller

Pluripotente ES celler selvfornyer seg i kultur, mens de beholder evnen til å gi opphav til differensierte celler fra alle de tre kimlagene. På grunn av deres differensierings egenskaper,

bidrar ES celler til en verdifull modell for å undersøke celledifferensiering, og de kan vise seg å være nyttige for erstatning av skadede celler eller vev ved cellerterapi<sup>9</sup>. Det er både etiske og tekniske betenkeligheter knyttet bruken av humane ES celler. En human blastocyst må eksplanteres for å oppnå humane ES celler (figur 2), og videre kultivering av humane ES cellelinjer trenger et embryonisk "feeder layer" for vekst og vedlikehold<sup>5,10,11</sup>. Dette fører til etiske spørsmål i mange land og i denne sammenhengen vil en utvikling i å generere pluripotente ES liknende celler fra en annen kilde enn embryo, vise seg å være svært fordelaktig. Det finnes også en potensiell risiko assosiert med bruken av ES celler i en regenerativ medisinsk sammenheng, da ES celler har vist å danne teratocarcinoma etter en ektopisk transplantering.



**Figur 2. Opphavet til humane pluripotente stamceller.** Det er isolert tre typer humane pluripotente stamcellelinjer. Embryonale stamceller (ES) er derivert fra den indre celledmassen i en 4-5 dager gammel blastocyst. Embryonale kinceller (EG celler) er derivert fra føtalt vev og er isolert fra celler i gonadene til et 5-10 uker gammelt foster. Embryonale carcinoma (EC) celler er isolert fra en urkimcelle tumor som heter teratocarcinoma, men de er også oppdaget i testikkelkreft hos voksne. (Figur er modifisert fra Donovan 2001)

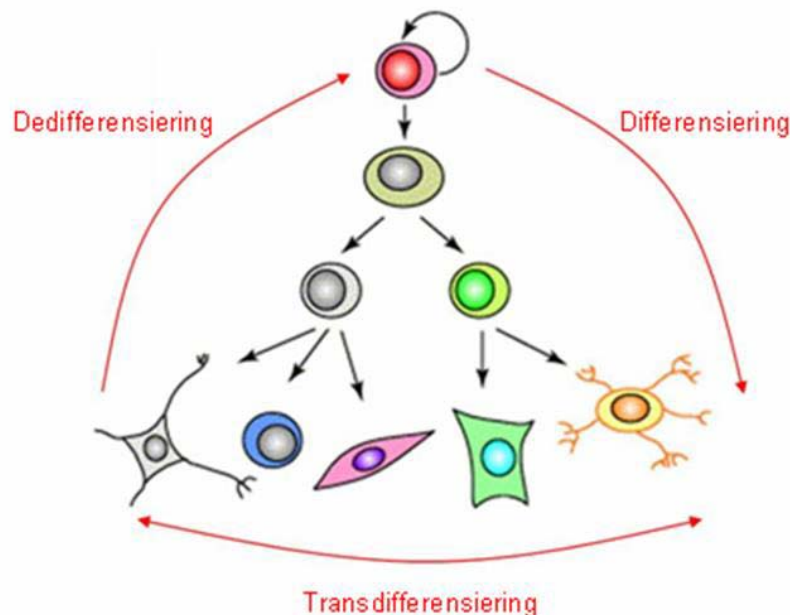
### Embryonale carcinoma celler

Embryonale carcinoma (EC) celler anses for å være ES celler som har tilpasset seg tumor vekst<sup>12</sup>. EC celler er pluripotente celler<sup>13</sup> isolert fra en kimcelle tumor som heter teratocarcinoma<sup>14</sup>. I motsetning til ES celler krever ikke EC celler spesielle embryonale vekstbetingelser<sup>15</sup>, mens de i likhet med ES celler er pluripotente og kan danne alle de tre kimlagene<sup>16</sup>. Genekspresjonsprofilen til EC celler er noe forskjellig fra ES celler, men generelt sett er de like. For eksempel uttrykker både humane ES og EC celler embryonale gener som *OCT4*, *SOX2*, *FOXD3*, *NANOG*, *FZD7*, *DNMT3B* og *TERF1*<sup>16,17</sup>. Octamer-bindende transkripsjonsfaktor4 (Oct4), som også kalles Pou5f1, er et medlem i POU familien av transkripsjonsfaktorer<sup>18</sup>, og blir ofte brukt som en klassisk markør for pluripotens i studier om differensiering og dedifferensiering. Oct4 transkripsjonsfaktoren binder til flere identifiserte målgener slik som *SOX*, *UTF1*, *REX1* og *OPN*<sup>19</sup> som sammen med *STAT3*<sup>20</sup>, *NANOG*<sup>21,22</sup> og *FOXD3*<sup>23</sup> er involvert i vedlikehold av en pluripotent tilstand. Likhetene i genekspresjonsprofilene til EC og ES celler kan reflekteres av deres vedlikehold av en pluripotent tilstand, mens forskjellene kan skyldes EC cellenes adaptasjon til tumorvekst. Gitt betenkelighetene med bruken av humant embryonalt materiale, gir udifferensierte humane teratocarcinoma EC celler et verdifullt alternativt eksperimentelt system for undersøkelse av differensieringsprosesser.

I denne oppgaven ble det brukt en pluripotent mannlig human teratocarcinoma cellelinje; NCCIT<sup>24,25</sup>, for å etablere en eksperimentell plattform for identifisering av nødvendige og tilstrekkelige komponenter i et celleekstrakt for å reprogrammere differensierte celler. NCCIT celler er kommersielt tilgjengelige, lette å kultivere i laboratoriet og har en kjent genekspresjonsprofil<sup>17</sup>.

## Naturlig plastisitet

Under normale forhold er en differensiert celle vanligvis stabilt forpliktet, men det finnes imidlertid både naturlig forekommende og eksperimentelle bevis på at dedifferensiering og transdifferensiering forekommer. Dedifferensiering refererer til en prosess hvor en differensiert celle blir mindre spesialisert, og karakteriseres med tap av differensierings markører og en ervervelse av prolifererings aktivitet<sup>26,27</sup>. Transdifferensiering referer til overgangen fra en differensiert celletype til en annen differensiert celletype, eller fra en mellomstadiecelle til en annen<sup>28,29</sup> (figur 3).



**Figur 3. Plastisitet.** Stamceller differensierer til andre celletyper. Transdifferensiering refererer til en overgang fra en somatisk celletype til en annen, eller fra en mellomstadiecelle til en annen. Mens dedifferensiering refererer til en prosess hvor en differensiert celletype får karakteristikk som vanligvis er typiske for stamceller. (Figur er modifisert fra Collas 2003)

## Dedifferensiering

Et klassisk eksempel på naturlig forekommende dedifferensiering er regenereringen av et tapt lem hos teleost fisk og urodele amfibier. I motsetning til sårheling hvor epitelceller migrerer til såret og skaper arrvev, blir et nytt lem regenerert via en prosess som krever migrering, dedifferensiering, proliferering og redifferensiering av epitelceller i det skadede området<sup>30</sup>.

Regenereringen involverer med andre ord erstatning og gjenopprettelse av voksen vevsmasse med en normal arkitektur og funksjon.

Evnen til å regenerere er meget begrenset hos pattedyr, og i kontrast til urodele amfibiers organregenerering, gjør pattedyrs regenerering seg ofte bruk av pre-eksisterende stamceller som differensierer til spesifikke celletyper<sup>31</sup>. Det finnes imidlertid sporadiske eksempler på regenerering hos pattedyr også. Dette inkluderer tilbakevekst av gevir, fingertupper og komplett lukking av hull i øret indusert på en spesiell muselinje (healer MRL mus). Healer MRL mus har kapasitet til å fullstendig lukke hull i øret uten dannelsen av arrvev som ville forekommet ved sårheling<sup>32,33</sup>, dette er med andre ord en form for regenerering<sup>32,34</sup>. I tillegg kan healer MRL mus også reparere hjertevev etter et normalt irreversibelt infarkt, uten hjelp av medisiner, celleterapi eller noen annen form for inngripen<sup>35</sup>. En rimelig hypotese er dermed at det finnes et potensiale for å gjenopprette pluripotens i somatiske celletyper, i hvert fall hos noen pattedyr.

### **Transdifferensiering**

Transdifferensiering forekommer naturlig hos insekter, amfibier og mange vertebrater<sup>28</sup>. Et eksempel på transdifferensiering hos amfibier er regenerering av øyelinsen etter at den er fjernet kirurgisk. Etter fjerningen ble pigmenterte celler i iris depigmentert og begynte å proliferere slik at de tilslutt dannet en ny linse som var umulig å skille ifra den originale<sup>29,36</sup>.

Et veldokumentert tilfelle hos pattedyr, er oppdagelsen av hepatocytter i bukspyttkjertelen til rotter som en respons på en kopperfattig diett<sup>37-39</sup>. Mangel på kobber viste seg å skape en irreversibel utarming av over 80 % av de acinære cellene i bukspyttkjertelen i tillegg til at kanalcellene transdifferensierte til hepatocytter. Bukspyttkjertel-hepatocytter uttrykker flere lever-spesifikke gener, slik som *Albumin* og *Urate Oxidase*<sup>37-39</sup>.

## **Eksperimentelt induisert plastisitet**

Bevisene på cellers plastisitet i naturen, har ført til eksperimenter som prøver å induisere dedifferensiering og transdifferensiering av somatiske celler i laboratoriet. Forandring av en differensiert celleds funksjon involverer en reprogrammering av celleds transkripsjonelle program. Flere eksperimenter indikerer at en celleds funksjon kan, i hvert fall til en viss grad, bli manipulert, -eller reprogrammert. Disse reprogrammeringsmetodene involverer transplantering av en somatisk cellekjerne inn i et ufertilisert egg, cellehybridisering eller behandling av en donorcelle med et ekstrakt preparert fra en målcelle (celletypen en ønsker å endre donorcellen til).

### **Kjernetransplantasjon**

Et klassisk eksempel på eksperimentelt induisert dedifferensiering er vist ved en funksjonell reprogrammering av en differensiert cellekjerne ved å transplantere den inn i et ubefruktet egg eller oocyt. Transplantasjonen av en somatisk cellekjerne fra en voksen *Xenopus laevis* inn i et *Xenopus* egg har resultert i rumpetroll som ble klekket som normalt<sup>40</sup>. En somatisk cellekjerne fra pattedyr som ble transplantert inn i cytoplasma til *Xenopus* egg, økte sin transkripsjonelle aktivitet<sup>41</sup>, som ble etterfulgt av protein syntese<sup>42</sup>. Injeksjon av en permeabilisert pattedyr-tymocyt inn i kjernen til en *Xenopus* oocyt, viste at komponenter fra oocyt kjernen førte til aktivering av pluripotensmarkøren *Oct4*, og nedregulering av differensieringsmarkøren *Thy1*. Dette illustrerer spesifisiteten til den transkripsjonelle reprogrammeringen<sup>43</sup>. Gener som inaktiveres under differensiering kan med andre ord bli reaktivert ved hjelp av cytoplasmatiske komponenter fra oocytten<sup>42</sup>. Mekanismen bak reprogrammering er enda ikke forstått fullt ut, men mye tyder på at DNA demetylering er påkrevd, i hvert fall ved kjernetransplantasjon<sup>44</sup>.

Hos pattedyr har somatisk cellekjernetransplantasjon resultert i levende fødte avkom i flere arter, hvor det mest kjente eksempelet er sauen Dolly<sup>45</sup>. Mer nylig er dette også vist i kanin<sup>46</sup>

og katt<sup>47</sup>. Somatisk cellekjernetransplantasjon har også resultert i pluripotente ES celler fra klonede blastocyster i mus og kyr<sup>48-50</sup>. På tross av disse suksessene, er kloning av pattedyr svært ineffektivt. De fleste rekonstruerte embryo utvikles abnormalt<sup>51</sup>, hvilket indikerer at det ikke er enkelt å reversere restriksjonene en differensiert cellekerne får under utviklingen. Siden mange av disse abnormalitetene ikke er arvet, antas det at de ikke skyldes feil i kromosomreplikasjon, men heller en mangelfull reprogrammering av epigenetiske karakteristikk, spesielt på pregede gener<sup>52</sup>.

### **Cellefusjon**

Parallelt med utviklingen av somatisk cellekjernetransplantasjoner, viste cellefusjonerings-eksperimenter at en differensiert somatisk cellekerne kan bli epigenetisk reprogrammert til å uttrykke embryonale gener<sup>53,54</sup>. ES celler kan indusere pluripotens i somatiske celler inkludert tymocytter<sup>54</sup>, nevronale mellomstadieceller<sup>55</sup> eller beinmarg deriverte celler<sup>56</sup>, og føre til induksjon av alle de tre kimlagene i chimerisk mus<sup>54,56</sup>. Det er vist at EC celler kan indusere transkripsjon av markører som tyder på pluripotens, fra T-lymfoma cellegenomet<sup>15</sup>. Nylig er det vist at fusjon mellom humane ES celler og diploide fibroblastceller fører til hybrider med et tetraploid kromosominnhold som har en morfologi, vekstrate og et ekspresjonsmønster av overflatemolekyler som er karakteristisk for humane ES celler. Genom-omfattende analyser av transkripsjonell aktivitet, allelsespesifikk genekspresjon og DNA metyleringer viste at fibroblast genomet var nesten fullstendig reprogrammert til en embryonal tilstand<sup>57</sup>.

Differensiering av ES-fibroblast hybridene *in vivo* produserte celletyper fra alle de tre kimlagene<sup>57</sup>. Disse resultatene støtter studier utført i mus og viser at humane ES celler kan reprogrammere differensierte kjerner. Kromatin-immunopresipitasjons analyser av histonmodifiseringer i somatiske celler etter fusjon med ES celler, støtter at ES celler kan reprogrammere epigenomet<sup>58</sup>. Samlet tyder dette på at hybridisering fører til en viss

epigenetisk reprogrammering ved at faktorer fra udifferensierte celler endrer genekspresjonen til de differensierte celletypene.

### **Celleekstrakt**

Den vellykkede produksjonen av ES celler og klonede avkom ved hjelp av kjerne-transplantasjoner, og DNA demetylering av embryonale gener i somatisk-ES celle hybrider, indikerer at udifferensierte celler inneholder regulatoriske faktorer nødvendige for å indusere pluripotens i udifferensierte celler. Dette har ført til et grunnlag for utviklingen av cellefrie strategier for å indusere reprogrammering i stamceller eller udifferensierte celler. Et ekstrakt fra en valgt målcelle antas å inneholde de regulatoriske komponenter som er nødvendige for å endre funksjonen til en gitt celletype over til målcelletypen<sup>59</sup>. Celleekstraktbaserte systemer for reprogrammering av en celledes funksjon, er utviklet med det mål å finne ut av somatisk celle dedifferensiering, transdifferensiering eller stamcelledifferensiering.

Reprogrammering med et celleekstrakt preparert fra lyserte målceller har ført til tegn på differensiering av somatiske og embryonale stamceller. Lysat fra cardiomyocytter fra et rottefoster har vist å fremme ekspresjon av cardiomyocyt proteiner og funksjoner i humane fett mesenchymale stamceller<sup>60</sup>. Disse markørene inkluderte sarcomerisk  $\alpha$ -aktin, troponin I, desmin, dannelsen av "gap-junctions" og, i mindre enn 2 % av cellene, kontraksjon i kultur<sup>60</sup>. Nylig har et ekstrakt fra pneumocytter induisert differensiering av muse ES celler slik at de viste en pneumocyt fenotype og uttrykte et pneumocyt-spesifikt transgen<sup>61</sup>.

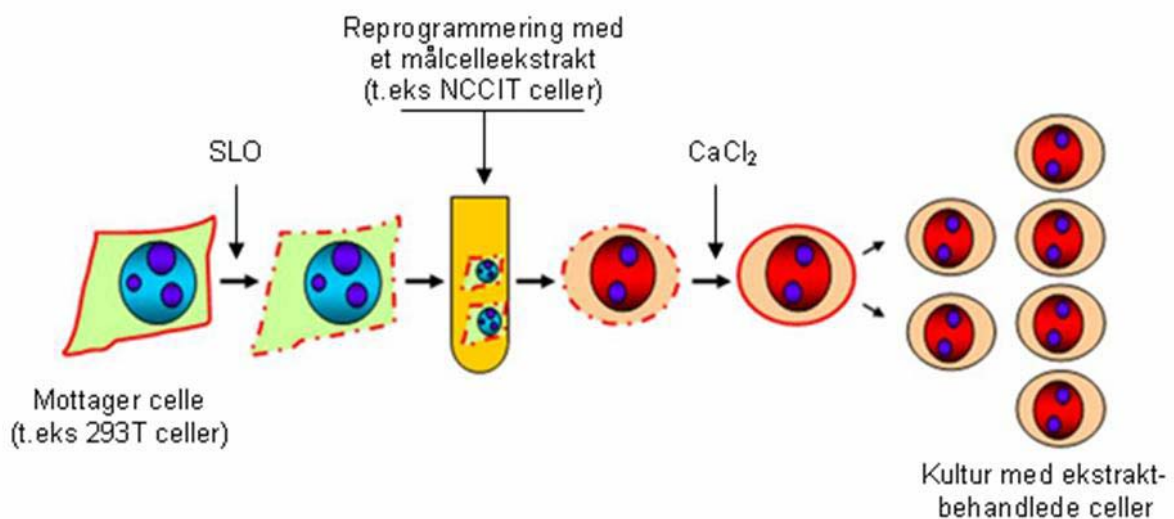
Reprogrammering med et celleekstrakt preparert fra lyserte målceller har induisert transdifferensiering av somatiske celler. Celleekstrakt fra Jurkat T-celler har ført til reprogrammering av 293T celler, som vist ved induksjon av T-celle egenskaper som histon H4 hyperacetylering<sup>62</sup>, ekspresjon av T-celle spesifikke gener<sup>63</sup> og T-celle spesifikke intracellulære signalveier<sup>63,64</sup>. Tilsvarende har bukspyttkjertel-spesifikke gener, *Pdx1* og *Insulin*, blitt induisert i rotte primære fibroblaster behandlet med insulinoma INS1E



celleekstrakt<sup>65</sup>. Noen av disse nye fenotypene viser seg å være stabile selv etter flere måneder i kultur, men det finnes ingen data på stabiliteten *in vivo*.

Reprogrammering med et ekstrakt fra lyserte målceller har induisert dedifferensiering av somatiske celler. Et ekstrakt preparert på celler fra regnerende salamander lemmer har induisert dedifferensiering hos differensierte muse C2C12 myotuber<sup>66</sup>. Myotubene ble utsatt for ekstrakt over flere dager, og det viste seg at 18 % av myotubene gikk inn i cellesyklus igjen, og 15-30 % av myotubene nedregulerte muskelspesifikke markører. Omtrent 10 % av myotubene gikk også inn i mitose, hvor omtrent halvparten av disse fortsatte proliferering som et monolag i kultur<sup>66</sup>. Dette viser at den dedifferensierte fenotypen beholdes selv etter fjerning av ekstraktet, og dette tyder på cellene, i hvert fall til en viss grad er reprogrammert. Ekstrakt basert på *Xenopus* egg kan indusere ekspresjon av pluripotens markører som *Oct4* og ”*germ cell alkaline phosphatase*” (*Gcap*), og nedregulere differensieringsmarkører i 293T celler (en kommersielt tilgjengelig human embryonal nyrekreft epitelcellelinje) og primære leukocytter<sup>67</sup>. Reprogrammering med et ekstrakt preparert fra uddifferensierte teratocarcinoma NCCIT celler kan indusere dedifferensiering i 293T celler slik at de viser NCCIT celleliknende morfologi, oppregulering av *OCT4* og Oct4 responsive gener som *SOX2* og ”*alkaline phosphatase*” (*APL*), samt nedregulering av en differensierings markør *laminaA* (*LMNA*)<sup>68</sup>. I tillegg ble transkripsjonelle markører for ”multilineage” differensiering oppregulert<sup>68</sup>. Dette indikerer at NCCIT ekstraktbehandlete celler, i likhet med somatiske stamceller, kan krysse kimlaggrensene, i det minste *in vitro*. Samlet indikerer dette at et ekstrakt til en viss grad kan reprogrammere genekspresjonen til en differensiert celle. På tross av disse lovende resultatene kreves det en betydelig utvikling av ekstraktbasert reprogrammering før den kan få en reell klinisk anvendelse. Det finnes til eksempel ingen data på varigheten til målcellefenotypen på mer enn noen få måneder, og disse studiene baserer seg på *in vitro* karakterisering av de ekstraktbehandlete cellene. Men i motsetning til

kjernetransplantasjon og cellefusjonerings-systemene, kan betingelsene for reprogrammering med et celleekstrakt relativt enkelt endres på, slik at molekylære mekanismer og faktorer som er involvert i reprogrammering kan identifiseres. En slik identifisering vil ikke bare føre til en mer målrettet og stabil reprogrammering, men bidra med viktig informasjon om epigenetiske reguleringsmekanismer. Reprogrammering med et celleekstrakt som beskrevet av Taranger *et al.*<sup>68</sup> involverer en reversibel permeabilisering av donorcellers plasmamembran (til eksempel 293T celler) med *Streptococcus pyogenes* toksinet Streptolysin O (SLO). De permeabiliserte cellene blir deretter inkubert i et ekstrakt preparert fra en målcelletype (til eksempel NCCIT celler), etterfulgt av  $\text{CaCl}_2$ -mediert lukking av SLO porene og videre kultivering (figur 4). Denne oppgaven tok sikte på å etablere en eksperimentell plattform for identifisering av nødvendige og tilstrekkelige komponenter i teratocarcinoma NCCIT celleekstrakt for å oppnå reprogrammering av 293T celler.



**Figur 4. Reprogrammering av permeabiliserte celler ved bruk av celleekstrakt.** Mottagercellene blir reversibelt permeabilisert med det poredannende toksinet Streptolysin O (SLO) og inkubert i et ekstrakt preparert fra valgt målcelle. SLO porene blir lukket ved hjelp av  $\text{CaCl}_2$  og cellene blir videre kultivert. (Figur er modifisert fra Håkeli 2004)

## MÅLSETNING

Ekstrakt preparert fra udifferensierte humane teratocarcinoma NCCIT celler er vist å reprogrammere reversibelt permeabiliserte 293T epitelceller slik at de uttrykte egenskaper typiske for udifferensierte celler og fikk et potensiale for pluripotens<sup>68</sup>. Hovedmålet med denne oppgaven var å etablere en eksperimentell plattform for identifisering av nødvendige og tilstrekkelige komponenter i teratocarcinoma NCCIT celleekstrakt for reprogrammering av 293T celler. Slik identifikasjon involverer fraksjonering av ekstraktet i et antall fraksjoner som krever modifikasjon av eksisterende reprogrammeringsoppsett. Det er viktig i en slik sammenheng å kartlegge effekten av modifikasjonene. For å oppnå dette valgte jeg å etablere en plattform hvor cellene som skal reprogrammeres vokser adherent i brønner, i motsetning til i eksisterende oppsett hvor cellen reprogrammeres i suspensjon. Dette vil forenkle håndteringen av reprogrammering med mange fraksjoner i samtidige forsøk.

Målet med denne oppgaven var derfor:

1. å etablere en eksperimentell plattform for reprogrammering av celler ved å undersøke:
  - a) morfologi og vekstmønster hos 293T celler i kultur på plast.
  - b) effekt av adherent kultur på opptak av makromolekylære markører
  - c) effekt av adherent kultur på reprogrammering med ekstrakt
2. å etablere en fraksjoneringsmetode for å separere makromolekyler i nativ tilstand kompatibel med reprogrammering av celler, og å karakterisere valgte fraksjoneringsmetode med hensyn på:
  - a) tilfredstillende separering av ekstrakt komponentene
  - b) karakterisering av fraksjonenes komponenter
  - c) reprogrammerings aktivitet

## MATERIALER OG METODER

### Celler

Embryonale carcinoma celler (NCCIT) og 293T celler (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) ble dyrket i RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) med 10 % føtalt kalveserum (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1 mM natriumpyruvat (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 mM ikke-essensielle aminosyrer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) og 1 % penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (komplett RPMI 1640 medium). Agate Noer preparerte og stilte sjenerøst til rådighet 293T celler som ved hjelp av Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) var katoinsk lipid-mediert transfektet med plasmid pEGFP-N1 (GenBank Accession #U55762, Clontech Laboratories, Mountain View, CA) (heretter referert til som 293T-EGFP celler). 293T-EGFP cellene uttrykker et "enhanced green fluorescent protein" (EGFP) og et gen for geneticin resistens. EGFP-293T cellene ble dyrket i komplett RPMI 1640 medium supplert med 700 µg/ml antibiotika G-418 sulfat; Geneticin (Promega, Madison, WI). Ved 80 % tetthet ble cellene høstet ved forsiktig dunking på kultiveringsflasken (Nunc, Roskilde, Danmark), og videre kultivert etter 1:6 til 1:8 fortynninger.

### Ekstraktpreparering

For å preparere totalt NCCIT celleekstrakt, ble cellene høstet, vasket to ganger i kald fosfatbufret saltløsning (PBS) og én gang i kald cellelyseringsbuffer (CLB). CLB inneholdt 100 mM HEPES (N-[2-Hydroksyetyl]piperazin-N'-[2-etansvovelsyre]), pH 8,2, 50 mM NaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 10 µl 100 × "stockløsning"/ml buffer proteaseinhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) og 1 mM av hver ditiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) og fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF)

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cellene ble videre sedimentert ved  $400 \times g$ , resuspendert i  $1 \times$  volum av kald CLB, og inkubert i 30–45 minutter på is. Cellene ble sonikert på is i alikvoter på 200  $\mu$ l ved bruk av Labsonic-M puls-sonikator (35 % power, 0,4 sekunders intervaller i  $2 \times$  30 sekunder; med et tillegg på 20 sekunder når nødvendig) med en 3 mm diameter probe (Sartorius BBI Systems, Bethlehem, PA). For å sikre at alle cellene og cellekjernene var lysert, ble lysatet undersøkt ved fasemikroskopering. Lysatet ble sedimentert ved  $15\,000 \times g$  i 15 minutter ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i en fast vinkel bordsentrifuge for å pelletere grovmaterialet. Supernatanten (ekstraktet) ble overført til et nytt 1,5 ml rør og alikvotert i 100  $\mu$ l i 200  $\mu$ l PCR rør, fryst i flytende nitrogen og oppbevart ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Lysatet av  $200\,000 \pm 70\,000$  celler ble brukt til å generere 1  $\mu$ l ekstrakt. Proteinkonsentrasjon til NCCIT ekstrakt var  $19 \pm 8\text{ mg/ml}$ . Dette ble bestemt ved å måle absorbansen ved 595 nm i et Helios Delta spektrofotometer (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, Waltham, MA) etter et Bradford assay, som beskrevet av produsenten (Bio-Rad, Hercules, CA, Hercules). pH ble bestemt ved hjelp av pH papir (Assistant) til å være  $8,0 \pm 0,5$ . Og osmolariteten av ekstraktet ble bestemt med Fiske 110 Micro-Sample osmometer (Fiske associates, Norwood, MA) til å være  $578,5 \pm 40,5\text{ mOsm}$ . Om nødvendig ble ekstraktet fortynnet i MQ H<sub>2</sub>O før bruk, for å justere osmolariteten til omtrent 300 mOsm.

Ekstrakt fra EGFP-293T og 293T celler (kontroll ekstrakt) ble preparert som beskrevet ovenfor, bortsett fra at CLB inneholdt 20 mM istedenfor 100 mM HEPES, sonikeringstiden var på  $3 \times 30$  sekunder istedenfor  $2 \times 30$  sekunder, og til slutt at EGFP-293T ekstrakt ble fortynnet i CLB istedenfor MQ H<sub>2</sub>O. Proteinkonsentrasjon til EGFP-293T celleekstrakt var  $18,5 \pm 1,5\text{ mg/ml}$  og 293T celleekstrakt hadde en konsentrasjon på  $32 \pm 10\text{ mg/ml}$ . pH av EGFP-293T celleekstrakt var på  $7,0 \pm 0,5$  og 293T celleekstrakt var på  $8,5 \pm 0,5$ . Osmolaritet til EGFP-293T celleekstrakt var på  $536 \pm 22,7\text{ mOsm}$  og 293T celleekstrakt hadde en osmolaritet på  $565 \pm 57\text{ mOsm}$ .

## **Permeabilisering av plasmamembranen med Streptolysin O (SLO)**

### **SLO permeabilisering av adherente 293T celler**

Det ble sådd ut 60 000 293T celler per brønn i en 24-brønners plate (Nunc, Roskilde, Danmark) som inneholdt dekkglass behandlet med 0,01 % poly-L-lysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) og dyrket i komplett RMPI 1640 medium. Ved 80 % tetthet ble cellene vasket to ganger i forvarmet PBS, og én gang i forvarmet  $\text{Ca}^{2+}$ - og  $\text{Mg}^{2+}$ -fritt "Hank's balanced salt solution" (HBSS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En SLO arbeidsløsning ble preparert ved å tite en alikvot av SLO stockløsning (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; på 100 µg/ml), og fortynne den 1:10 i HBSS på is. Cellene ble behandlet med 400 µl av forskjellige SLO konsentrasjoner som varierte fra 0-250 ng/ml, og inkubert i forskjellige tidspunkter fra 0-60 minutter ved 37 °C og 5 %  $\text{CO}_2$  i luften.

### **SLO permeabilisering av 293T celler i suspensjon**

Suspenderte 293T celler ble vasket to ganger i kald PBS og én gang i kald  $\text{Ca}^{2+}$ - og  $\text{Mg}^{2+}$ -fritt HBSS. Cellene ble resuspendert i alikvoter på 100 000 celler/100 µl HBSS (eller mangedobling derav), plassert i 1,5 ml rør og sentrifugert ved  $120 \times g$  i 5 minutter ved 4 °C i en sving-ut rotor. Sedimenterte celler ble suspendert i 99 µl kald HBSS og 1 µl kald SLO arbeidsløsning, slik at endelig SLO konsentrasjon ble 100 ng/ml. Prøvene ble inkubert horisontalt i et vannbad i 30 minutter ved 37 °C med forsiktig risting innimellom, og deretter satt på is. Prøvene ble fortynnet med 100 µl kald HBSS, og cellene ble sedimentert ved  $120 \times g$  i 5 minutter ved 4 °C.

## **Inkubering med markør eller ekstrakt**

### **Inkubering av adherente 293T celler i brønner med et Texas Red-dextran konjugat, 293T-EGFP- eller NCCIT celleekstrakt**

Adherente celler i brønner, permeabilisert med SLO, ble inkubert i en time ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i luften enten med 400 µl HBSS som inneholdt 100 µg/ml Texas Red-dextran konjugat (70 000 Da) (Invitrogen, Carlsbad, CA) og 3 mg/ml Bovint serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), eller med 200 µl av EGFP-293T, NCCIT eller 293T ekstrakt. Alle inneholdt i tillegg et adenosintrifosfat (ATP) regenererende system (2,5 mM ATP, 125 mM GTP, 25 mM fosfokreatin (PC) og 62,5 µg/ml kreatine kinase (CK); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), og 1 mM av hver nukleotidtrifosfat (NTP); ATP, GTP, CTP og UTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland). Etter endt inkubering ble cellene tilsatt komplett RPMI 1640 medium som inneholdt 2 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck, Damstad, Tyskland) for å lukke SLO porene, og videre inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i luften. Etter 2 timer ble cellene dyrket i komplett RPMI 1640 medium.

Adherente 293T celler som ikke på forhånd var permeabilisert med SLO, ble først vasket to ganger i forvarmet PBS, og én gang i forvarmet Ca<sup>2+</sup>- og Mg<sup>2+</sup>-fritt HBSS før inkubering med 293T-EGFP, NCCIT eller 293T ekstrakt. Deretter ble de behandlet som beskrevet ovenfor. Forskjellige proteinkonsentrasjoner av EGFP-293T ekstraktet, ble preparert ved å fortynne utgangskonsentrasjonen på ~20 mg/ml i CLB slik at proteinkonsentrasjonen varierte fra 5 til 20 mg/ml.

### **Inkubering av suspenderte 293T celler i totalt eller fraksjonert NCCIT celleekstrakt**

Etter SLO permeabilisering ble 293T cellene suspendert i 100 000 celler/100 µl totalt eller fraksjonert NCCIT ekstrakt (eller mangedobling derav), som inneholdt ATP-regenereringssystem og NTP som beskrevet ovenfor. Prøvene ble inkubert horisontalt i 1 time

ved 37 °C i et vannbad med forsiktig risting innimellom. Komplette RPMI 1640 medium med 2 mM CaCl<sub>2</sub> ble tilsatt cellene før de ble overført til en 24-brønners plate. Etter 2 timers inkubering i 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i luften, ble celler som ikke hadde festet seg fjernet, og de adherente cellene dyrket videre i komplett RPMI 1640 medium.

## **Mikroskopering**

Morfologibildene av cellene ble tatt ved regulær lysmikroskopi, 40 × objektivlinse. For å ta bilder med fluorescens eller konfokalt mikroskop, ble dekkglass med adherente 293T celler, tatt ut av brønnene og plassert opp-ned på et objektglass i en dråpe med totalt RPMI medium. Adherente 293T celler inkubert i EGFP-293T ekstrakt eller Texas Red-dextrat konjugat (med eller uten SLO permeabilisering) ble undersøkt i OLYMPUS BX51 fluorescens mikroskop med en eksitasjons lyskilde (UV laser), og emissjons og eksitasjonsfiltre. Bildene ble tatt med Olympus fargekamera, 40 × objektivlinse og analysert med AnalySIS program.

De konfokale bildene av adherente 293T celler inkubert i EGFP-293T ekstrakt, ble tatt med et Olympus fluoview 1000 (FV 1000) konfokalt scanningssystem koblet til et motorisert invertert konfokalt mikroskop; Olympus IX81, med en 40 × objektivlinse. Bildene ble tatt ved hjelp av FV 1000 versjon 1.4 programvare i suksessive z-akse serieseksjoner med en økning på 1 µm for hvert steg, med en Kalman og linje filter modus og zoomfaktor på 2. Eksitasjonslyset kom fra en LD405 laser, og det optiske elementet til kondenseren var IX2-DIC40.

## **Genekspresjonsanalyser**

### **RNA isolering**

Cellepelleter ble preparert ved 80 % tetthet fra  $1 \times 10^6$  adherente 293T celler reprogrammert med NCCIT celleekstrakt, to uker etter ekstrakt behandlingen. Cellene ble overført til 1,5 ml rør og sedimentert ved  $1\,000 \times g$  i 10 minutter i romtemperatur (RT). Cellepelletene ble



vasket én gang i kald PBS og sentrifugert ved  $1\,000 \times g$  i 10 minutter ved RT. Supernatant ble fjernet, og cellepelleten ble fryst i flytende nitrogen og oppbevart ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Total RNA ble isolert fra cellepelletene ved hjelp av Sigma GenElute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) som beskrevet av produsenten; lyseringsløsning som inneholdt 1 % 2-mercaptoetanol ble tilsatt cellepelleten og homogenisert ved pippetering. Lysatet ble overført til GenElute filtrerings kolonne og sentrifugert ved  $18\,000 \times g$  i 2 minutter ved RT i en fast vinkel bordsentrifuge for å fjerne overflødig cellemateriale og fragmentert DNA.  $1 \times$  volum av 70 % etanol ble tilsatt “flow trough” (gjennomstrømningen) og homogenisert før det ble overført til en GenElute bindingskolonne og sentrifugert ved  $18\,000 \times g$  i 15 sekunder ved RT. Kolonnen ble vasket én gang i vaskeløsning 1 før det ble overført til et nytt RNase-fritt rør fra Sigma GenElute settet. For å fjerne genomisk DNA fra prøvene ble kolonnen behandlet med 80 µl DNase I arbeidsløsning og inkubert i 15 minutter ved RT. DNase I (Qiagen, Hilden, Tyskland) stockløsningen ble preparert ved å løse 1500 Kunitz enheter DNase pulver i 550 µl RNase-fritt vann, og en arbeidsløsning ble preparert ved å tilsette 10 µl av DNase I stock-løsning til 70 µl Buffer RDD. Kolonnen ble vasket én gang i vaskeløsning 1, overført til et nytt rør fra Sigma GenElute settet, og vasket to ganger i vaskeløsning 2 som inneholdt etanol. Kolonnen ble plassert i enda et nytt rør fra settet for å eluere RNA med 50 µl RNase-fritt vann, og sentrifugert ved  $18\,000 \times g$  i 1 minutt ved RT. 2 µl RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega, Madison, WI) per 50 µl RNA prep ble tilsatt “flow through”.

### **cDNA syntese**

cDNA ble laget fra 1µg totalt RNA isolert fra adherente 293T celler reprogrammert i NCCIT celleekstrakt, ved bruk av et iScript™ cDNA syntese sett (Bio-Rad, Hercules, CA). 4 µl av  $5 \times$  iScript reaksjonsblanding, 1µl iScript revers transkriptase, 2-14 µl nukleasefritt vann og 1 µg RNA ble blandet til et totalt volum på 20 µl. cDNA syntesebetingelsene var  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 5

minutter, 42 °C i 30 minutter og 85 °C i 5 minutter. cDNA prøvene ble oppbevart ved -20 °C. cDNA syntese, uten revers transkriptase, ble utført som kontroll for tilstedeværelsen av genomisk DNA for hver RNA preparering.

### **Kvantitativ revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (Q RT-PCR)**

Adherente 293T celler reprogrammert i NCCIT celleekstrakt ble undersøkt for ekspresjon av utvalgte gener med Q RT-PCR. Reaksjonene ble utført i triplikater og ved bruk av IQ™ SYBRGreen Superscript (Bio-Rad, Hercules, CA) på en BioRad MyCycler Thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA). Amplifisering ble utført i et totalt volum på 25 µl i en Iqycler IQ™ PCR 96-brønners plate (Bio-Rad, Hercules, CA, Hercules). IQ™ SYBRGreen Superscript reaksjonsblandingen bestod av 12,5 µl IQ™ SYBR Green supermix, 1,25 µl av et primer sett (0,5 mM av hver primer), 5 µl cDNA arbeidsløsning (fortynnet 1:10 i MQ H<sub>2</sub>O) og 6,25 µl MQ H<sub>2</sub>O. RT-PCR betingelsene var 95 °C i 3 minutter, 40 sykluser med 95 °C i 30 sekunder, 60 °C i 30 sekunder og avslutningsvis 72 °C i 30 sekunder. Et humant husholdningsgen *glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH)* ble brukt som normaliseringskontroll (transkript-spesifikke primere er oppramset i supplerende tabell 1). Smeltepunktsanalyser (supplerende figur S1) startet ved 60 °C, med en økning på 0,5 °C for hvert 15. sekund opp til 95 °C. PCR produktene ble oppbevart ved -20 °C. MyiQ Single-Color Real Time PCR Detection programvare ble brukt til dataanalysene. Det relative ekspresjonsnivået til stamcellemarkørene *OCT4*, *REX1* og differensieringsmarkøren *LMNA* i de ekstraktbehandlede cellene ble sammenlignet med ubehandlede 293T celler. Dette ble beregnet ut fra gjennomsnittlig terskelverdi (Ct) (supplementfigur S2) og PCR effektivitet til hver primer<sup>69</sup>. PCR effektivitet til hvert primerpar ble bestemt ved hjelp av LinREG programmet<sup>70</sup>.

## Fraksjonering

En kontinuerlig tetthetsgradient ble preparert ved å sentrifugere 400 µl 30 % vektvolum (v/v) Nycodenz AG (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norge) i 10 mM Tris, pH 7,3 i tykkveggede polykarbonatrør for TLA 120.1 rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA) på  $512\,900 \times g$  i 4 timer ved 4 °C i en fast vinkel Table Top Optima™ MAX ultrasentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Nycodenz er et merkenavn for iohexol. NCCIT ekstrakt ble fraksjonert ved en ”rate-zonal” gradient sentrifugering hvor 100 µl ekstrakt ble lagt som et smalt bånd over den kontinuerlige tetthetsgradienten og sentrifugert ved  $128\,200 \times g$  i 1 time ved 4 °C i Beckman Optima™ MAX ultrasentrifugen. Fraksjoner på 40 µl ble høstet ved å aspirere fra toppen, fryst i flytende nitrogen, og oppbevart ved -80 °C. Tettheten til fraksjonene ble bestemt ved å måle absorbansen på 244 nm i et Helios Delta spektrofotometer etter 1:10 000 fortynning i destillert vann (dH<sub>2</sub>O). Proteinkonsentrasjon, osmolaritet og pH ble bestemt som beskrevet for ekstraktpreparering.

## Elektroforese

### SDS-Polyakrylamid gel elektroforese (SDS-PAGE)

10 % SDS-PAGE ble utført for visualisere en proteinprofil av det fraksjonerte ekstraktet. Proteiner ble presipitert ved inkubasjon i 10 % triklor-eddiksyre (TCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) i minimum 2 timer ved RT, sedimentert ved  $18\,000 \times g$  i 15 minutter og vasket i eter. Presipitatet ble kokt i SDS-PAGE prøvebuffer som inneholdt 1 mM DTT før de ble applisert i brønnene. Etter endt elektroforese ble gelen farget ved å inkubere den i 2,5 µg/ml Coomassie Brilliant Blue R250 (Bio-Rad, Hercules, CA). Størrelsen av produktene ble bestemt ved hjelp av Rainbowstandard RPN 756 (GE Healthcare, Buckinghamshire, England).

**Agarose gel elektroforese**

0,7 % Sea Kem LE agarose (Cambrex BioScience Rockland Inc, Rockland, ME) gel elektroforese behandlet med etidiumbromid (EtBr) ble utført for å visualisere en RNA profil av det fraksjonerte ekstraktet. Fraksjonene ble først behandlet med 500 µg/ml DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) i PBS og inkubert i et vannbad i 30 minutter ved 37 °C. Prøvene ble tilsatt 6 × prøvebuffer (Promega, Madison, WI) før de ble applisert i brønnene. Gelene ble visualisert i et GEL DOC 2000 system (Bio-Rad, Hercules, CA, Hercules, CA, Hercules, CA) og størrelsen av produktene ble bestemt ved hjelp av 1 Kb DNA molekylvektsmarkør (Promega, Madison, WI). Som kontroll ble det utført en 0,7 % agarose gel elektroforese på fraksjoner som tillegg var blitt inkubert i et vannbad i 30 minutter ved 37 °C med 100 µg/ml RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland).

## RESULTATER

Målet med denne oppgaven var å etablere en eksperimentell plattform og en ekstrakt-fraksjoneringsmetode som kan brukes i reprogrammeringsforsøk. Med en slik eksperimentell plattform vil det være mulig å identifisere nødvendige og tilstrekkelige komponenter i NCCIT celleekstrakt for reprogrammering av 293T celler.

### Etablering av en multibrønnplate plattform

Reprogrammeringsmetoden etablert av Taranger *et al.* er basert på behandling av 293T celler med bakterie-toksinet Streptolysin O (SLO) i suspensjon. Fraksjonering av ekstraktet fører til behov for et oppsett som kan behandle et større antall prøver enn det eksisterende oppsettet kan. En multibrønnplate er bedre egnet enn celler i suspensjon for å sikre like betingelser for celler inkubert med et større antall ekstraktfraksjoner. En multibrønnplate plattform vil forhåpentligvis permeabilisere adherente 293T celler etter innledende vaskeprosedyrer, etterfulgt av inkubering i NCCIT celleekstrakt og  $\text{CaCl}_2$ -mediert lukking av SLO porene i plasmamembranen.

For å undersøke om en multibrønnplate kan anvendes til reprogrammering, ble adherente 293T celler undersøkt for opptak av to markører; et Texas Red-dextran konjugat (molekylvekt 70 KDa) eller et 293T celleekstrakt fra celler som uttrykker ”enhanced green florescent protein” (EGFP) (293T-EGFP celler). De adherente cellene ble undersøkt for opptak av markørene både med og uten SLO mediert permeabilisering av cellene i forkant av inkubering med markørene, og med varierende konsentrasjons- og inkubasjonstider med SLO.

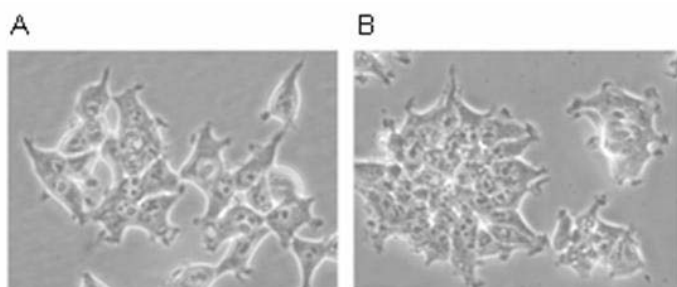
Innledende forsøk viste at 293T celler var løst festet til en ubehandlet plastoverflate, og løsnet fra plastoverflaten under vasketrinnene (data ikke vist). For å sikre adhesjon av cellene gjennom hele prosedyren, ble det dermed nødvendig å først så ut cellene på poly-L-lysin

behandlede dekkglass. Dekkglass ble benyttet for å kunne mikroskopere cellene med lys- og fluorescens mikroskop.

### Morfologi til adherente 293T celler

293T celler ble først undersøkt morfologisk ved å så dem ut på to forskjellige overflater, plast eller dekkglass behandlet med poly-L-lysin. 293T celler sådd ut på plast (figur 5A) eller dekkglass behandlet med poly-L-lysin (figur 5B) viste en normal morfologi for 293T celler, nemlig lik adherente epitel celler i et monolag. Cellene sådd ut på poly-L-lysin viste en svak tendens til å danne tettere kolonier ved lav celletetthet (data ikke vist). Vekstraten til de to forskjellige kulturene ble derimot ikke påvirket av hvilket underlag de ble dyrket på.

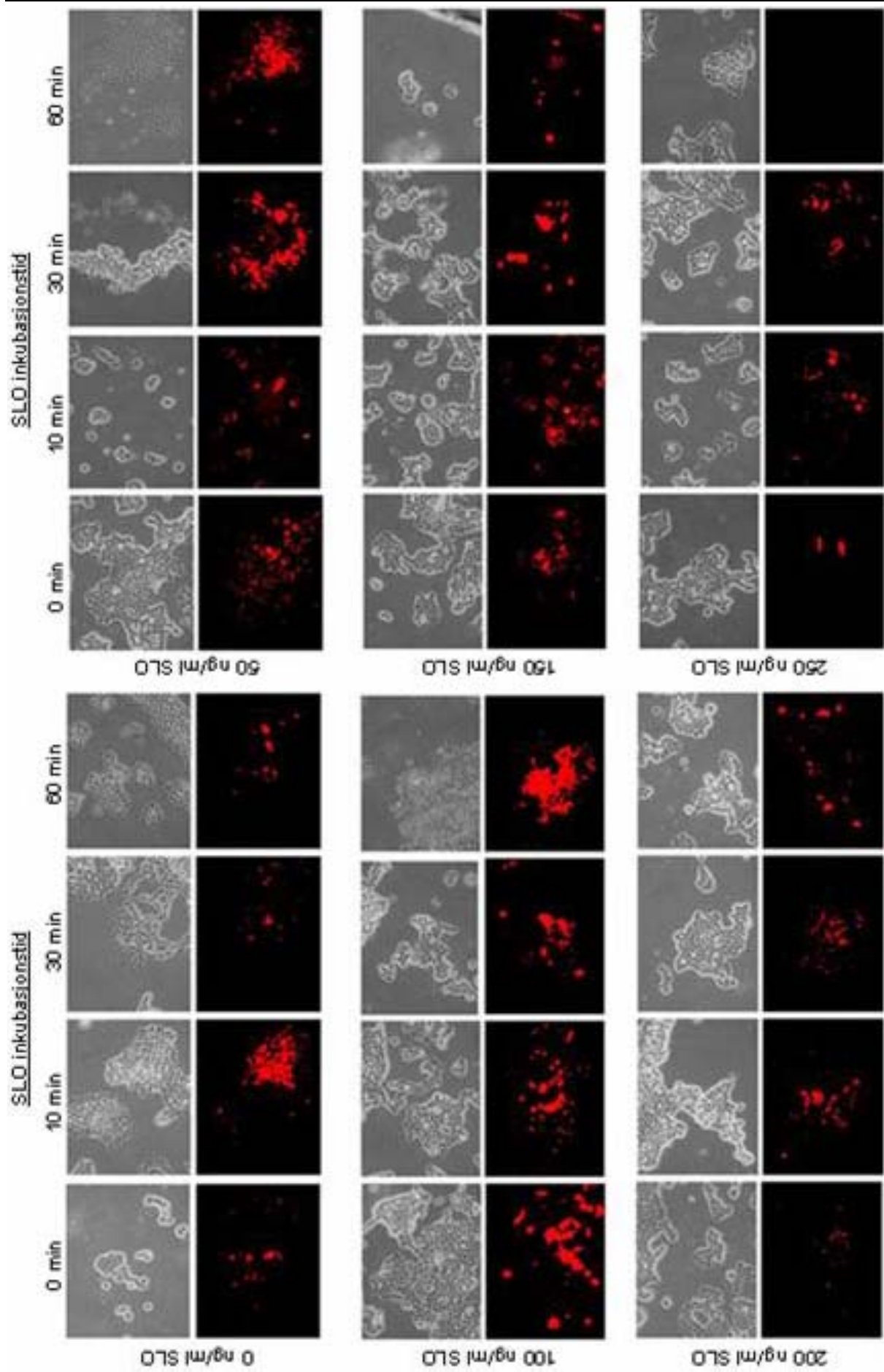
Forskjellene ble vurdert som ubetydelige, og for å sørge for at 293T cellene forble adherente gjennom hele multibrønnplate prosedyren, ble cellene i påfølgende forsøk sådd ut på dekkglass behandlet med poly-L-lysin.



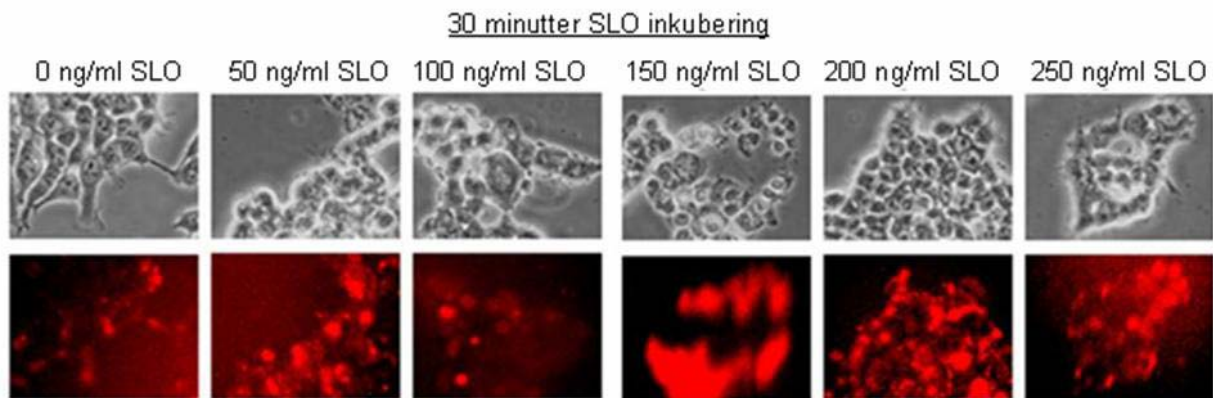
**Figur 5. Morfologi til adherente 293T celler.** (A) 293T celler sådd ut på en plastoverflate. (B) 293T celler sådd ut på dekkglass behandlet med poly-L-lysin. Begge viser typisk 293T celle morfologi som er adherente fibroblast-liknende celler i et monolag.

### Opptak av makromolekylære markører i adherente 293T celler

For å undersøke adherent cellekulturs kompatibilitet med reprogrammering med ekstrakter, ble et Texas Red-dextran konjugat eller et 293T-EGFP celleekstrakt brukt som mål på opptak etter en reversibel permeabilisering med SLO. Adherente 293T celler ble permeabilisert med SLO konsentrasjoner fra 0-250 ng/ml i 0-60 minutter etterfulgt av 60 minutters inkubering



B

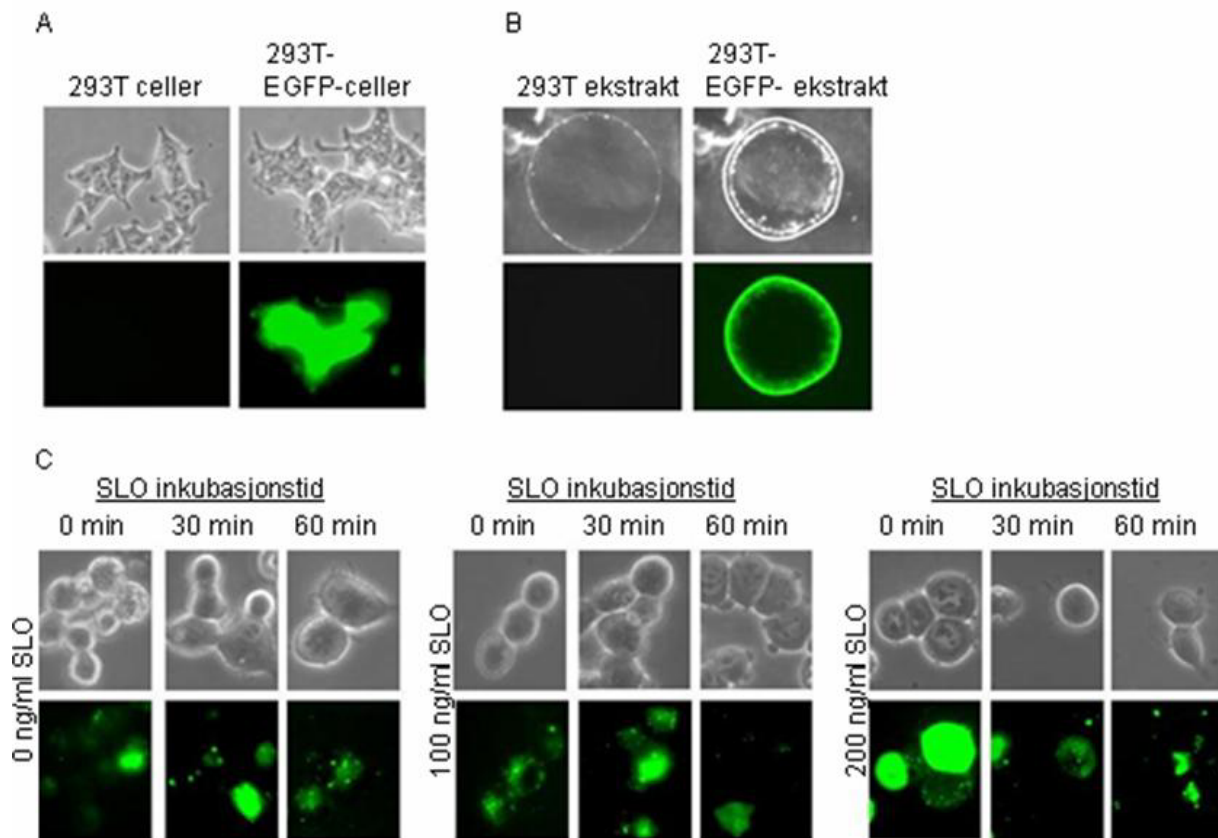


**Figur 6. Reversibel permeabilisering av adherente 293T celler med SLO, med et Texas Red-dextran konjugat som mål på opptak.** (A) Forskjellige konsentrasjoner av SLO fra 0 til 250 ng/ml og inkubasjonstider fra 0 til 60 minutter. (B) Forstørrede bilder av 30 minutters inkubering i SLO ved konsentrasjoner fra 0 til 250 ng/ml.

med Texas Red-dextran konjugatet. SLO-porene ble lukket med  $\text{CaCl}_2$  i 2 timer før mikroskopi. 293T celler inkubert med markøren viste Texas Red fluorescens i omtrent 50 % av cellene (figur 6A), hvilket indikerer at konjugatet er tatt opp av cellene. En jevn fluorescens ville vært forenlig med at konjugatet var tatt opp gjennom SLO-skapte porer, men fluorescensen var imidlertid flekkvis distribuert rundt i cellene (figur 6B). Dette antyder at konjugatet er tatt opp via endocytose og er lokalisert i endocytiske vesikler. Det kan ikke utelukkes at noe av fluorescensen som sees kommer fra uspesifikk assosiasjon av konjugatet til celleoverflaten. Interessant nok ble det ikke observert noen tydelig forskjeller i opptak av markøren i celler behandlet med forskjellige SLO konsentrasjoner og inkubasjonstider. Imidlertid viste en SLO konsentrasjon på 250 ng/ml, og spesielt en inkubasjonstid på 60 minutter, en økt celledød (data ikke vist).

Videre undersøkelser av adherente 293T cellers opptak av markører ble utført med ekstrakt preparert fra 293T-EGFP celler (figur 7A og B). Basert på resultatene om økt celledød ved SLO konsentrasjoner på 250 ng/ml, ble adherente 293T celler reversibelt permeabilisert med SLO konsentrasjoner fra 0-200 ng/ml i 0-60 minutter etterfulgt av ekstrakt inkubering og  $\text{CaCl}_2$ -mediert lukking av SLO porer. Gjennomsnittlig 20 % av de adherente 293T cellene

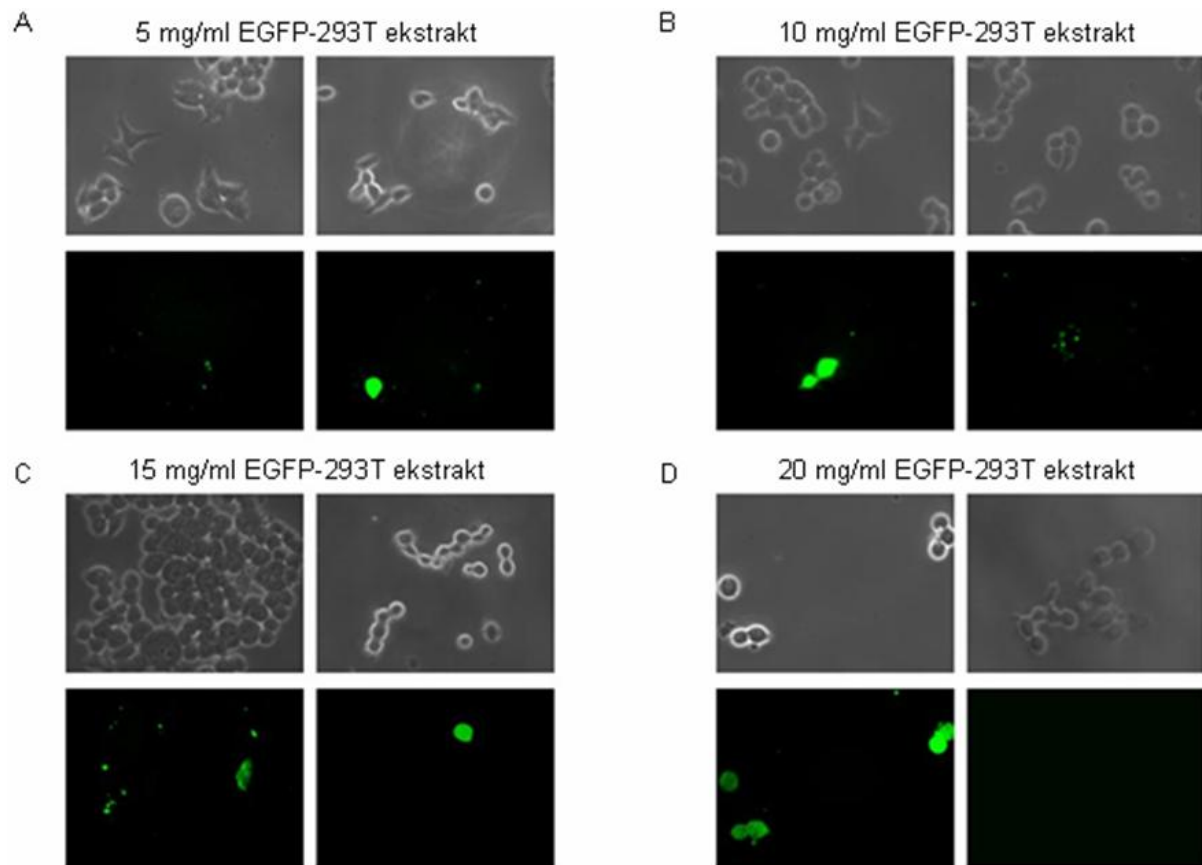




**Figur 7. Reversibel permeabilisering med SLO av adherente 293T celler, med 293T-EGFP celleekstrakt som mål på opptak.** (A) 293T celler versus fluorescerende 293T-EGFP celler. (B) Dråper av 293T celleekstrakt versus fluorescerende 293T-EGFP celleekstrakt. (C) Reversibel permeabilisering av adherente 293T celler med 0, 100 eller 200 ng/ml SLO, med 293T-EGFP celleekstrakt som mål på opptak.

viste en sterk EGFP fluorescens uavhengig av både SLO konsentrasjon og inkubasjonstid (figur 7C). Dette, i tillegg til den samme flekkvise distribusjonen av fluorescensen som ble observert med Texas Red konjugatet, underbygger muligheten for at SLO permeabilisering ikke er nødvendig for opptak av markørene. Observasjonene om at begge markørene blir tatt opp i cellene selv uten SLO permeabilisering, ble videre undersøkt ved mikroskopi av celler behandlet med EGFP-holdig celleekstrakt uten SLO permeabilisering i forkant av ekstraktbehandlingen.

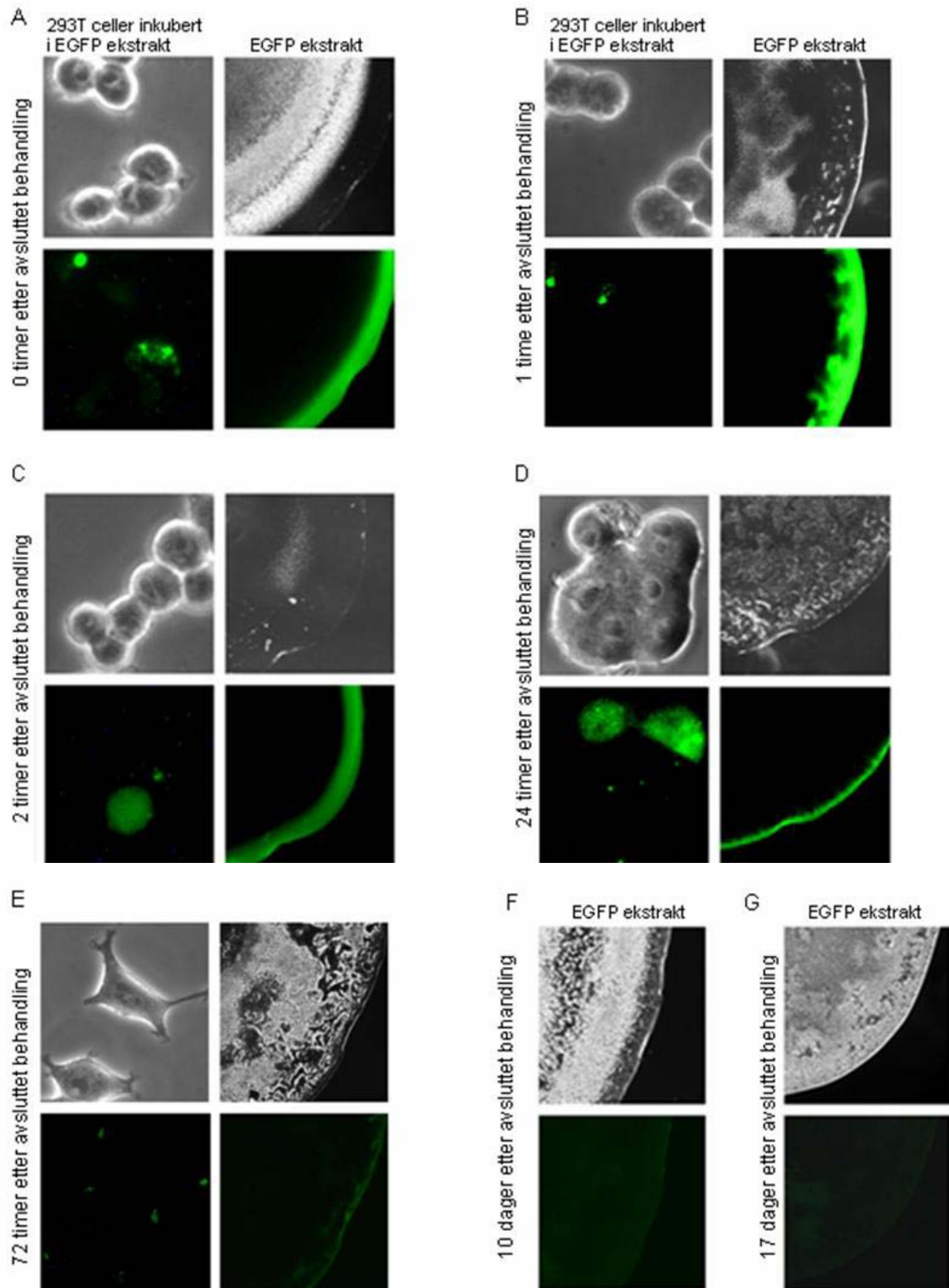
Effekt av varierende proteinkonsentrasjon i ekstraktene ble undersøkt ved å inkubere 293T cellene med 5, 10, 15 eller 20 mg/ml 293T-EGFP ekstrakt. Cellene ble deretter behandlet med 2 mM  $\text{CaCl}_2$  i 2 timer for ikke å avvike for mye fra regulært reprogrammeringsoppsett.



**Figur 8. Adherente 293T celler inkubert med forskjellige konsentrasjoner av 293T-EGFP celleekstrakt.** (A) Celler inkubert i 5 mg/ml ekstrakt. (B) Celler inkubert i 10 mg/ml ekstrakt. (C) Celler inkubert i 15 mg/ml ekstrakt. (D) Celler inkubert i 20 mg/ml ekstrakt.

Fluorescensmikroskopi viste sterk EGFP fluorescens fra omtrent 10 % av de ekstraktbehandlede 293T cellene ved alle proteinkonsentrasjonene (figur 8). Da en proteinkonsentrasjon på 10 mg/ml ser ut til å være tilstrekkelig for å tydeliggjøre opptak av markøren, ble dette brukt i alle videre eksperimenter med 293T-EGFP ekstrakter.

For å underbygge observasjonen om at opptak av markøren skjer uten SLO permeabilisering, og for å undersøke distribusjonen av EGFP proteinet i cellene over tid, ble 293T-EGFP ekstraktbehandlede celler undersøkt både ved fluorescens- og konfokal mikroskopi ved forskjellige tidspunkter. Bilder tatt direkte etter avsluttet behandling (hvilket innebærer 1 time ekstraktinkubering og 2 timer  $\text{CaCl}_2$ -mediert lukking av SLO porer), er indikert med tid 0 (figur 9A og B). Tilsvarende gjelder for de andre tidspunktene. Innen 1 time etter avsluttet behandling ble det observert en lyssterk flekkvis fluorescens. Etter 24 timer og senere er

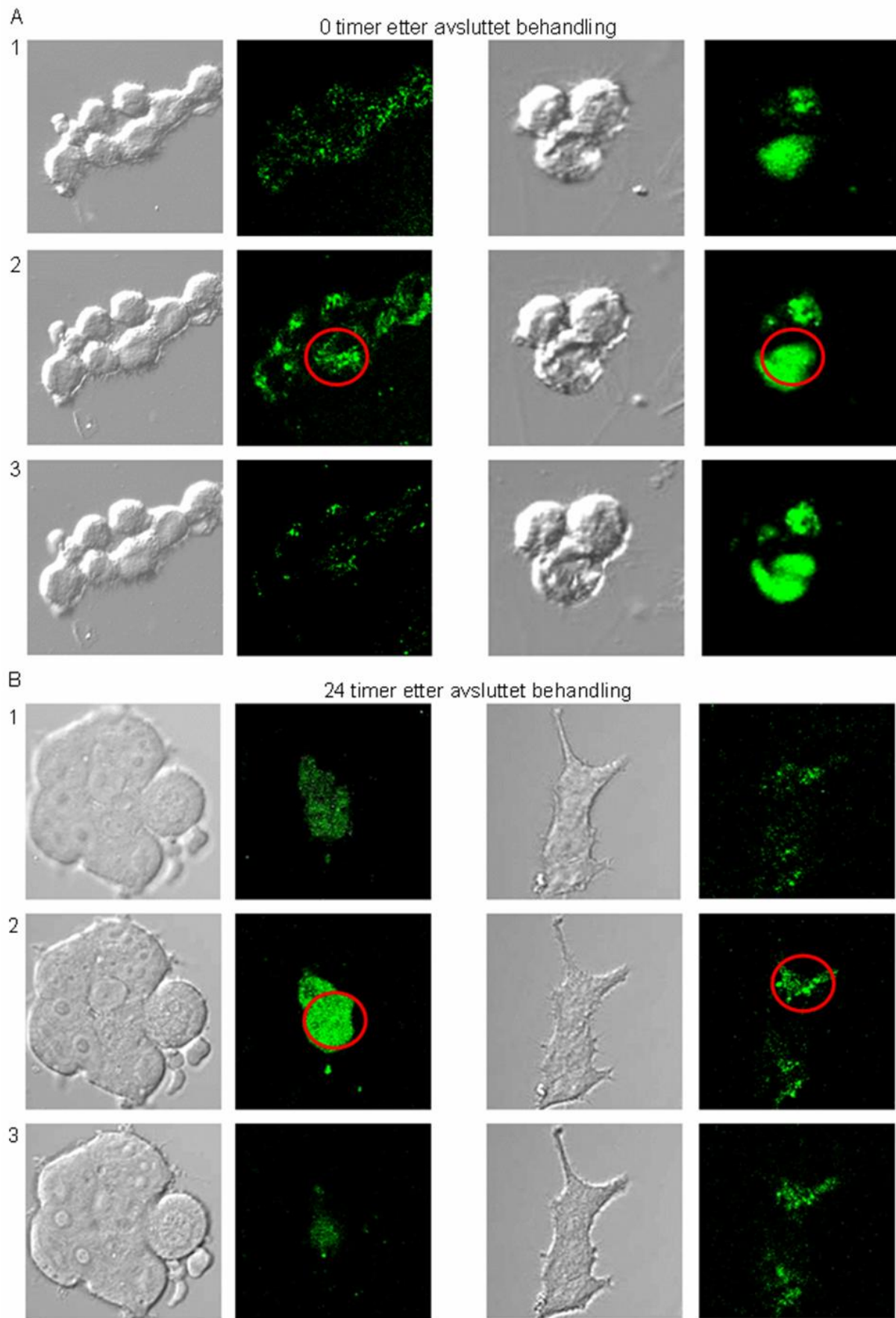


**Figur 9. Adherente 293T celler inkubert i 293T-EGFP ekstrakt ved indikerte tidspunkter etter avsluttet behandling.** (A) 0 timer etter avsluttet behandling. (B) 1 time etter avsluttet behandling. (C) 2 timer etter avsluttet behandling. (D) 24 timer etter avsluttet behandling. (E) 72 timer etter avsluttet behandling. (F) 293T-EGFP ekstrakt 10 dager etter avsluttet behandling. (G) 293T-EGFP ekstrakt 17 dager etter avsluttet behandling.

fluorescensen jevnere fordelt. Celledeling vil trolig føre til at EGFP protein som eventuelt er tatt opp i cellene blir fortynnet, og dette samsvarer med en tilnærmet udetekterbar fluorescens ved 72 timer etter avsluttet behandling (figur 9E). Alternativt, kan det skyldes intracellulær degradering av EGFP. For å teste EGFPs stabilitet, ble en brønn som kun inneholdt 293T-EGFP ekstrakt inkubert under de samme betingelsene som de ekstraktbehandlede 293T cellene. Fluorescensmikroskopi av ekstraktet viser tydelig fluorescens selv etter 17 dager (figur 9A-G), hvilket indikerer at den svakere fluorescensen ikke skyldes EGFP proteinets stabilitet per se. Ubehandlede 293T celler ble også mikroskopert som kontroll for bakgrunnsfluorescens og disse viste ingen fluorescens (data ikke vist).

Samlet viser disse resultatene at den flekkvise fluorescensen som er observert ved tidlige tidspunkter etter avsluttet behandling, fordeler seg jevnere over tid. Dette kan både skyldes at EGFP proteiner blir fordelt i cytosol, men også at proteinet kan være bundet til plasmamembranen og bli fordelt over plasmamembranen ved lateral diffusjon.

For å undersøke om fluorescensen var intra- eller ekstracellulær, ble utvalgte tidspunkter undersøkt ved konfokal mikroskopi. Bildene ble registrert i suksessive z-akse seksjoner (figur 10A og B). Panel 1 viser bilder fra topp-planet av cellen, 2 fra midtplanet cellen og 3 fra bunnplanet/glassoverflaten. Ved tid 0 etter  $\text{CaCl}_2$  behandling viser bildene tatt fra både bunnen og toppen av cellene fluorescens (figur 10A1 og 3), hvilket indikerer binding av EGFP til celleoverflaten. Det ble også observert fluorescens lokalisert til sentrum av cellene i plan med midten av cellene (figur 10A2, indikert med røde ringer), hvilket antyder at noe EGFP er tatt opp intracellulært. Tjuefire timer etter avsluttet behandling viser bildene tatt fra både bunnen og toppen av cellene (figur 10B1 og 3) lite fluorescens, hvilket antyder at EGFP er blitt tatt opp i cellene. Dette støttes av bildene fra midt-planet som viser tydelig fluorescens (figur 10B2, indikert med røde ringer).



**Figur 10. Konfokal mikroskopi av adherente 293T celler inkubert i 293T-EGFP ekstrakt.** Panel 1 viser bilder fra topp-planet av cellene, panel 2 fra midtplanet i cellene og panel 3 fra bunnplanet/glassoverflaten. (A) 0 timer etter avsluttet behandling. (B) 24 timer etter avsluttet behandling.

Samlet tyder disse resultatene på at EGFP proteinet blir tatt opp i cellene selv uten SLO permeabilisering. Opptaket er mest sannsynlig mediert via væskefase endocytose eller via uspesifikk binding til cellemembranen med påfølgende opptak sammen med reseptor mediert endocytose av andre ligander. Disse resultatene viser videre at et eksperimentelt oppsett hvor celler vokser adherent i brønner og behandles med ekstrakter, vil ta opp makromolekyler forenlig med reprogrammering med komplekse celle-ekstrakter.

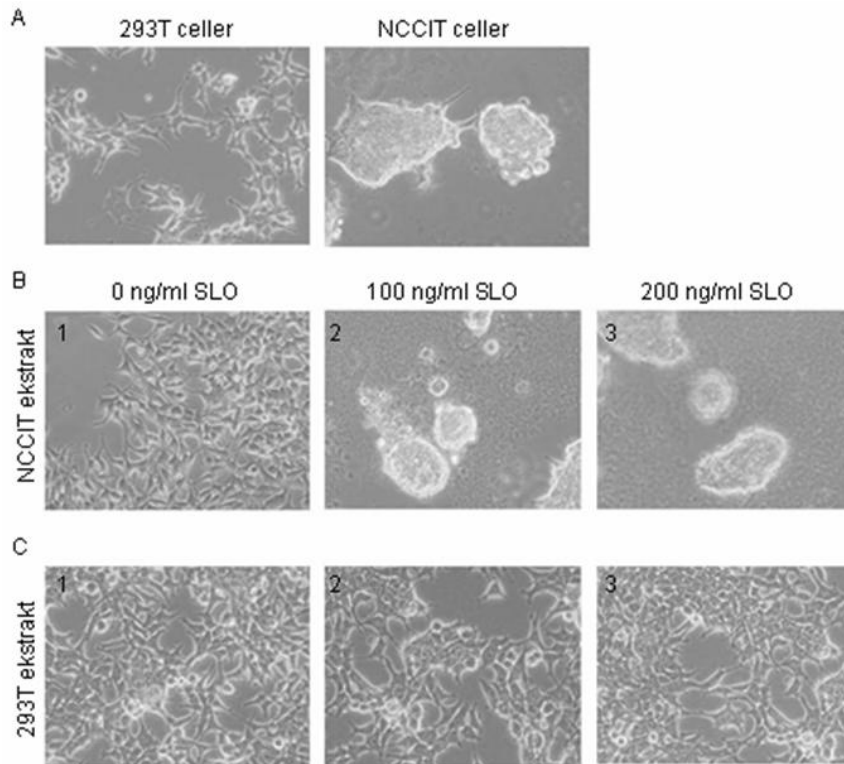
## **Reprogrammering av adherente celler med NCCIT ekstrakt**

Som en videre test på om oppsettet med adherente celler i brønner egner seg for reprogrammering, ble det utført ett reprogrammeringsforsøk i duplikater. Adherente 293T celler ble behandlet med 0 ng/ml, 100 ng/ml eller 200 ng/ml SLO i 30 minutter, etterfulgt av en times inkubering i celleekstrakt preparert fra NCCIT eller 293T (kontroll) celler.

Kultivering av de ekstraktbehandlede cellene ble etterfulgt av morfologiske analyser etter 1 uke, og genekspresjonsanalyser etter 2 uker for å undersøke induksjon av dedifferensiering.

### **Morfologiske analyser etter reprogrammering**

NCCIT celler vokser ikke alltid som et monolag og kan ofte danne aggregater, noe 293T celler ikke gjør (figur 11A). En uke etter ekstraktbehandling viste 293T cellene som kun var inkubert i NCCIT ekstrakt (det vil si uten SLO permeabilisering) ingen endring av vekstmønster (figur 11B1). I kontrast til dette dannet 293T celler behandlet med SLO i forkant av ekstraktbehandlingen kolonier med definerte kanter som likner på NCCIT kolonier (figur 11B2-3). At denne kolonidannelsen ikke kun er en konsekvens av ekstrakt -eller SLO-behandling per se, vises ved at 293T celler inkubert i 293T ekstrakt, både med og uten SLO ikke danner slike kolonier (figur 11C1-3).



**Figur 11. Morfologi til adherente 293T celler 1 uke etter SLO permeabilisering og inkubasjon i celleekstrakt.** (A) Ubehandlede 293T og NCCIT celler. (B) Adherente 293T celler inkubert i NCCIT celleekstrakt etter permeabilisering med 0, 100 eller 200 ng/ml SLO. (C) Adherente 293T celler inkubert i 293T celleekstrakt etter permeabilisering med 0, 100 eller 200 ng/ml SLO.

### Ekspresjon av pluripotensgener etter reprogrammering

For å evaluere graden av transkripsjonell reprogrammering av ekstraktbehandlede 293T

celler, ble kvantitativ reverse transkriptase PCR (Q- RT-PCR) utført på cDNA fra

ekstraktbehandlede celler høstet 2 uker etter reprogrammering. Induksjon av transkripsjon av

den klassiske markøren for pluripotens *Oct4*, og *Oct4* målgenet *REX1* ble undersøkt, i tillegg

til undertrykkelse av en markør for differensierte celler; *laminA* (*LMNA*). Uttrykk av disse

genene ble normalisert i forhold til ekspresjon av husholdningsgenet *GAPDH*. Figur 12 viser

resultatene fra Q RT-PCR analyser av de NCCIT ekstraktbehandlede cellene. Resultatene

viser 13 ganger oppregulering av et transkript med primere for *REX1* i ett av duplikatene som

ikke er blitt permeabilisert med SLO, i forhold til ubehandlede 293T celler. Imidlertid viser

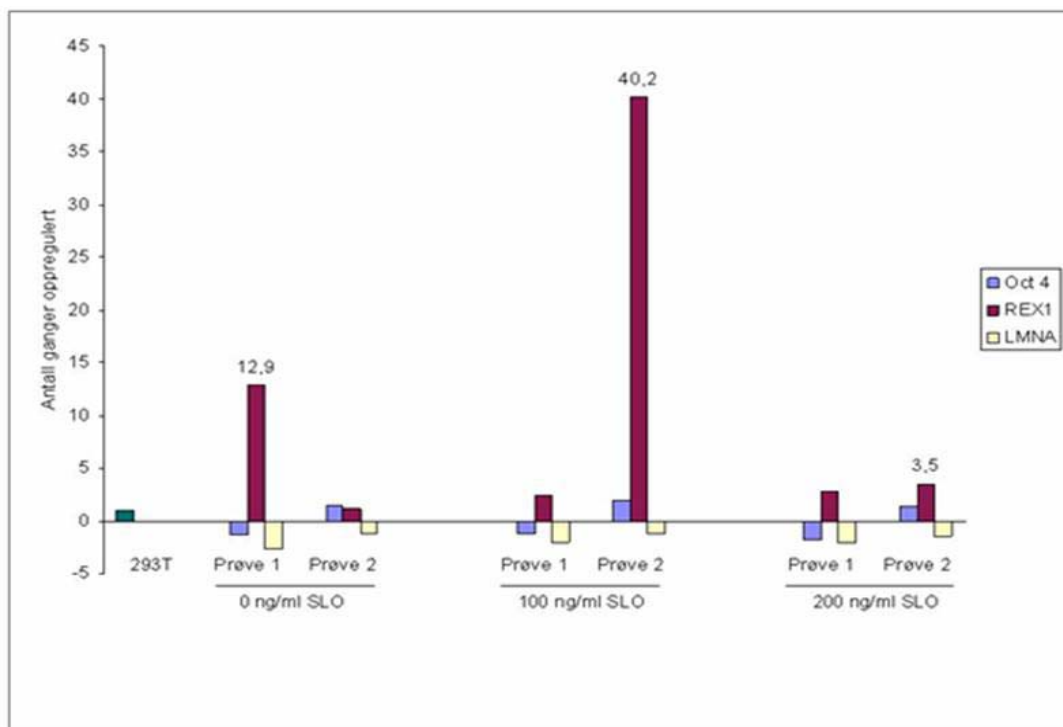
smeltekurvene at produktet ikke med sikkerhet kan tilskrives *REX1* (supplementfigur S1).

Både *Oct4* og *lamin A* er nedregulert med litt over 1 gang, men en opp- eller nedregulering



bør være på mer enn 3 ganger før forskjellene er betydelige. Prøve 2 viser ikke betydelig opp- eller nedregulering for noen av genene. For cellene behandlet med 100 ng/ml SLO i forkant av ekstraktbehandling, viser analysene at *REX1* er oppregulert med over 40 ganger i prøve 2. Smeltekurven verifiserer at produktet er *REX1*. Ingen av de andre markørene viste betydelig opp- eller nedregulering i noen av prøvene. For cellene behandlet med 200 ng/ml SLO i forkant av ekstraktbehandling, viser ingen av markørene betydelig opp- eller nedregulering i noen av prøvene.

Samlet kan disse resultatene tyde på at adherente celler i brønner egner seg for reprogrammering, da en viss endring i genekspresjonsprofilen ble observert. Denne endringen var uavhengig av om cellene på forhånd var permeabilisert med SLO eller ikke. En slik omfattende reprogrammering av 293T cellene som vist av Taranger *et al.*<sup>68</sup> ble ikke observert, men dette kan ikke utelukkes ved gjentakelser av eksperimentet. Av ukjente årsaker varierer graden av reprogrammering fra forsøk til forsøk.



**Figur 12. Relativ ekspresjon av *Oct4*, *REX1* og *lamin A* i NCCIT ekstraktbehandlede 293T celler, sammenliknet med ubehandlede 293T celler (nivå 1).** Antall ganger opp- eller nedregulering av *Oct4* (blå stolper), *REX1* (røde stolper) og *lamin A* (gule stolper) i 293T celler inkubert i NCCIT celle-ekstrakt etter permeabilisering med 0, 100 eller 200 ng/ml SLO. Ekspresjonsnivået i de ekstraktbehandlede cellene er relativ til ubehandlede 293T celler (grønn stolpe, nivå 1 for både *Oct4*, *REX1* og *laminA*).

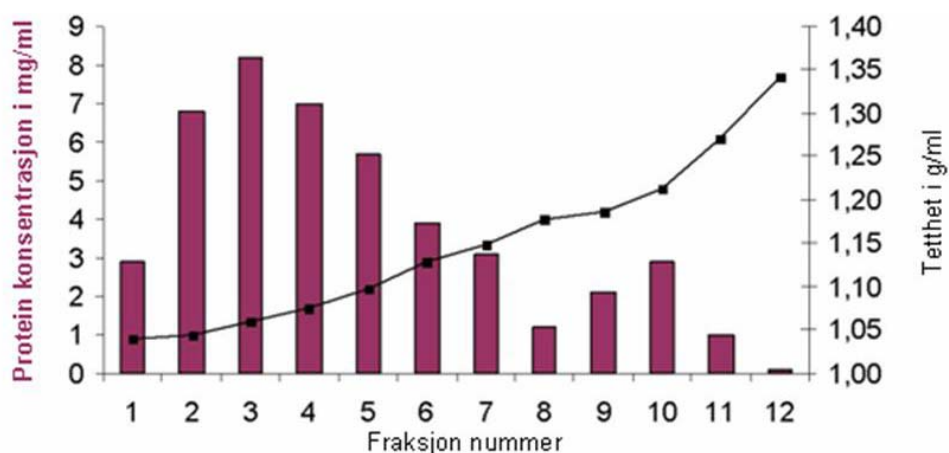


## Etablering av en fraksjoneringsmetode kompatibel med reprogrammering

Et NCCIT ekstrakt inneholder nødvendige komponenter for å føre til en reprogrammering av 293T celler i retning av en mer dedifferensiert tilstand<sup>68</sup>. For å kunne identifisere hvilke komponenter i ekstraktet som står for reprogrammering, ble ekstraktet fraksjonert med en Nycodenz tetthetsgradient, og fraksjoner ble høstet ved aspirering fra toppen. Betingelsene for generering av gradienten ble etablert ved måling av fraksjonenes tetthet. Tilfredsstillende separering av ekstraktkomponentene ble analysert ved en bestemmelse av protein konsentrasjon, protein- og RNA-profil av fraksjonene. Videre ble osmolaritet og pH i fraksjonene målt for å undersøke om fraksjonene ville føre til ufysiologiske betingelser ved tilsetning til celler.

### Etablering av betingelser for Nycodenz gradient.

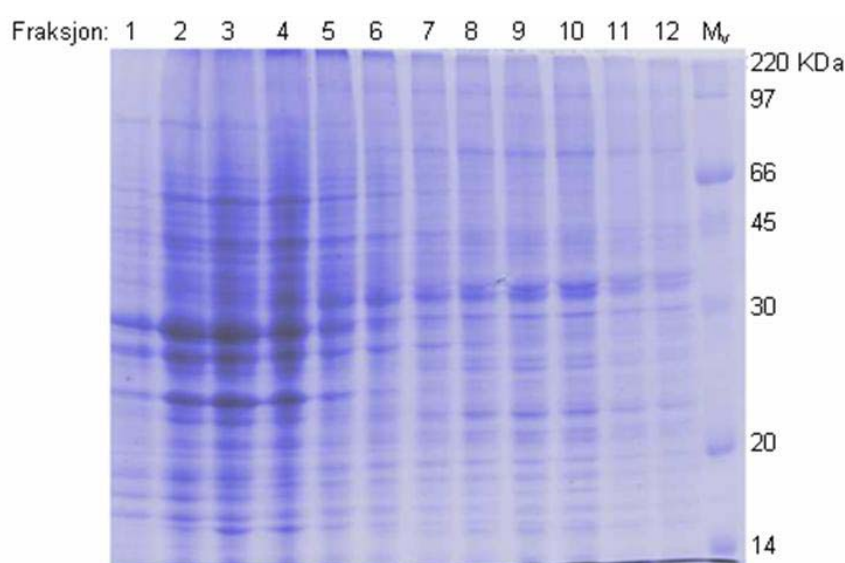
Etter fraksjoneringen av NCCIT ekstrakt ble tettheten av fraksjonene ble bestemt ved å måle absorbanse av fraksjonene ved 244 nm i et spektrofotometer. Tettheten av fraksjonene etter fraksjonering av NCCIT celleekstrakt er illustrert med en linje i figur 13. Tettheten øker mer eller mindre lineært fra den øverste til den nederste fraksjonen, fra 1,05 g/ml i toppfraksjo (1) til 1,35 g/ml i bunnfraksjonen (12), med en gjennomsnittlig økning på 0,025 g/ml per fraksjon.



**Figur 13. Tetthet og proteinkonsentrasjon i fraksjonert NCCIT celleekstrakt.** Fraksjon 1 er toppfraksjonen og 12 er bunnfraksjonen. Proteinkonsentrasjonen til fraksjonene er illustrert med stolper, mens tettheten er illustrert med en linje.

Proteinkonsentrasjonen for hver fraksjon ble bestemt ved å måle absorbansen ved 595 nm i et spektrofotometer etter et Bradford assay, med Bovint serum albumin (BSA) som standard. Proteinkonsentrasjonene til fraksjonert NCCIT celleekstrakt er illustrert med stolper i figur 13. Proteinkonsentrasjonen varierer fra 0,2 mg/ml til 8,1 mg/ml, og har to konsentrasjonstopper omtrent ved fraksjonene 2-4 og 9-10. Den høyeste proteinkonsentrasjonen finnes i fraksjonene 2-5, mens den laveste finnes i fraksjonene 8, 11 og 12. Disse parameterne viser at metoden gir en tilfredsstillende fordeling av proteinene i fraksjonene. I dette fraksjoneringsforsøket var proteinkonsentrasjonen til ufraksjonert ekstrakt på 20 mg/ml, og fraksjonert ekstrakt på 17,96 mg/ml. Dette gir et prosentvis utbytte av fraksjoneringen på 89,8 %.

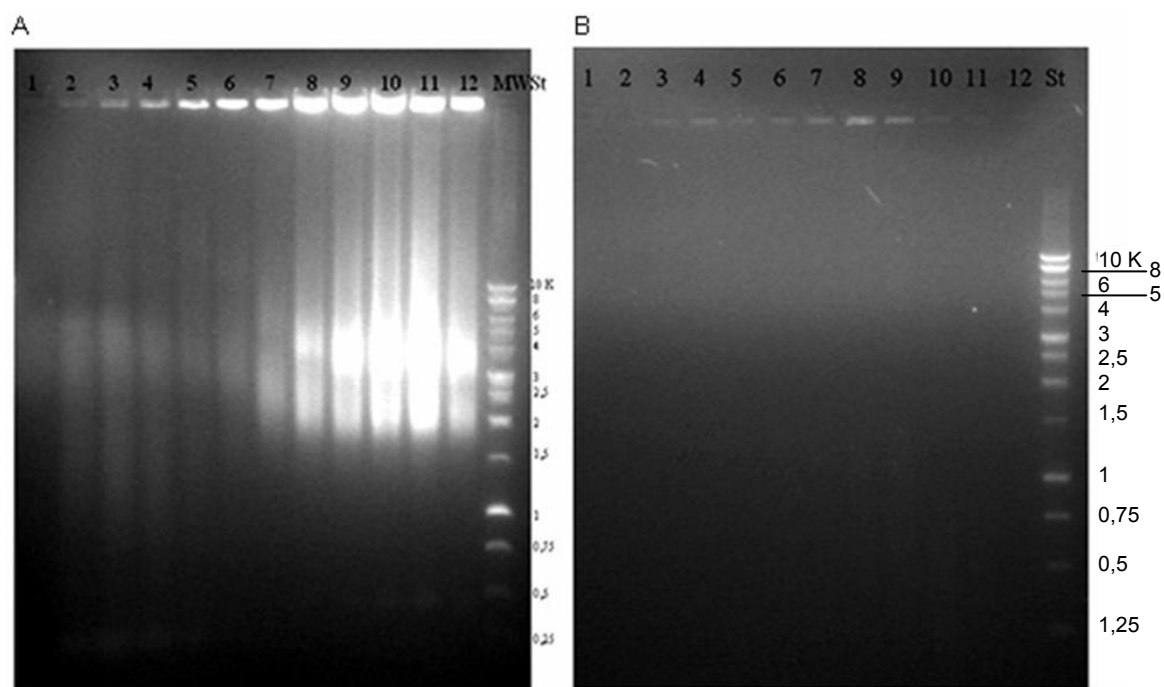
For å visualisere fordelingen av proteiner og RNA i fraksjonene av NCCIT ekstrakt, ble fraksjonene analysert med gel elektroforese; SDS-PAGE for analyse av proteinprofil og agarose gel elektroforese for analyse av RNA (etter DNase behandling i forkant av fraksjoneringen). Resultatene fra proteinkonsentrasjonen i figur 13 gjenspeiles også i proteinprofilen (figur 14); det er tydelig mer protein i fraksjonene 2-5 enn i de andre fraksjonene. Den høye proteinkonsentrasjonen skyldes for det meste proteiner med en molekylvekt på rundt 30 og 25 KDa. Ekstraktet består i utgangspunktet av komponenter som



**Figur 14. Fordelingen av proteiner i fraksjonert NCCIT celleekstrakt.** 10 % SDS-PAGE farget med Coomassie Brilliant Blue. Fraksjon 1 er toppfraksjonen og 12 er bunnfraksjonen, og det er brukt en High Range Rainbow molekylvektsmarkør.

ikke sedimenteres ved  $15\,000 \times g$  (se materialer og metoder). Størsteparten av proteinene har en størrelse på mellom 80 og 20 KDa. Det er lite sannsynlig at noen av proteinene stammer fra vekstmediet, da cellene ble grundig vasket under ekstraktprepareringen. Serum albumin ville i motsatt fall vært fremtredende, men det finnes ingen fremtredende bånd på 66 KDa som kan tilskrives serum albumin. Toppen i proteinkonsentrasjonen i fraksjon 9-10 skyldes for det meste proteiner med en molekylvekt på omtrent 35 KDa.

RNA profilen viser at bunnfraksjonene (fraksjonene 8-12) har de høyeste RNA konsentrasjonene (figur 15 A). Det er ingen tydelige bånd på gelen, men en fortetning av RNA species omtrent ved 3-4 Kb er som forventet siden de fleste mRNA transkripter er på omtrent 3 Kb. De lyssterke punktene i brønnene er enten DNA som har unnslettet degradert på grunn av assosiasjon med proteiner eller ribonukleoproteiner med så høy molekylvekt at de ikke vandrer inn i gelen. De lyssvake båndene ved omtrent 250 bp i fraksjonene 2-5 og ved 500 bp i fraksjonene 9-11, skyldes mest sannsynligvis degradert RNA. "Small interference" RNA (siRNA) og micro RNA farges dårlig av EtBr og vil trolig ikke bli



**Figur 15. Fordelingen av RNA i fraksjonert NCCIT celleekstrakt.** 0,7 % agarose gel farget med etidiumbromid. Fraksjon 1 er toppfraksjonen og 12 er bunnfraksjonen, og det er brukt en 1 Kb DNA molekylvektsmarkør. (A) Fraksjonene er behandlet med 500 µg/ml DNase. (B) Fraksjonene er behandlet med 100 µg/ml RNase A i tillegg til DNasen.

detektert selv om de er tilstede. I et parallelt forsøk ble fraksjonene behandlet med RNase A for å styrke observasjonen om at gelen visualiserte RNA, og ikke DNA (figur 15B). Det kan virke som om at det som ble antatt å være DNA i brønnene etter elektroforesen også forsvinner etter RNase behandling, noe som peker i retning av et dette er ribonuklein partikler. Samlet tyder resultatene på at komponentene i ekstraktet er separert på en tilfredsstillende måte.

### Fysiologiske egenskaper til fraksjonert ekstrakt

Fraksjonene ble til slutt undersøkt med hensyn på ionstyrke og pH for å sikre fysiologiske forhold ved behandling av celler med ekstraktfraksjonene. En osmolaritet på omtrent 300 mOsm/kg er ønskelig i et reprogrammeringsforsøk for å unngå at de ekstraktbehandlede cellene utsettes for osmotisk stress. De fleste osmolaritetsverdiene til fraksjonene var innenfor akseptable avvik fra denne verdien, og fraksjoner som avvek med  $\sim 100$  mOsm/kg ble fortynnet i MQ H<sub>2</sub>O (Tabell 1). Alle fraksjonene hadde en pH på rundt 7 som tilsvarer pH i bufferen som ble brukt ved preparering av gradienten. Innledende reprogrammeringsforsøk, basert på metoden beskrevet av Taranger *et al.*<sup>68</sup> (celler i suspensjon og SLO permeabilisering), utført både med fraksjonert og ufraksjonert ekstrakt, viste ingen tegn på at

Fraksjoner	Osmolaritet mOsm/kg
1 (topp)	340 $\pm$ 11
2	372 $\pm$ 13
3	336 $\pm$ 12
4	358 $\pm$ 9
5	362 $\pm$ 10
6	344 $\pm$ 13
7	327 $\pm$ 14
8	343 $\pm$ 9
9	336 $\pm$ 15
10	323 $\pm$ 11
11	338 $\pm$ 14
12 (bunn)	357 $\pm$ 11

**Tabell 1.** Osmolaritet til fraksjon 1 til 12

fraksjoneringen av ekstraktet førte til økt celledød hos de ekstraktbehandlede cellene (data ikke vist). Samlet tyder dette på at den valgte fraksjoneringsmetoden er kompatibel med reprogrammeringsforsøk. Fraksjoneringsmetoden kan lett modifiseres ved å endre konsentrasjon av tetthetsmediet (Nycodenz), på den måten vil fraksjoner med reprogrammeringsaktivitet kunne settes på nye gradient med andre karakteristikk og dermed å oppnå ytterligere rensing av aktive komponenter.

## DISKUSJON

Denne oppgaven har til hensikt å etablere en multibrønnplate plattform og en fraksjoneringsmetode til bruk i reprogrammeringsforsøk med komplekse celleekstrakter. Et Texas Red-dextran konjugat og et ekstrakt basert på 293T-EGFP celler ble brukt som mål på opptak av makromolekyler relevant for reprogrammering med ekstrakter. Resultatene viste opptak av markørene både med og uten SLO permeabilisering av de adherente cellene. Ett reprogrammeringsforsøk med adherente celler ble utført, og resultatene viste en ufullstendig reprogrammering. Samlet tyder resultatene på at en multibrønnplate kan anvendes til reprogrammering. I tillegg ble en fraksjoneringsmetode for å separere ekstraktkomponenter kompatibel med reprogrammering testet med hensyn på tilfredsstillende separering av ekstraktkomponentene og fraksjonenes fysiologiske egenskaper. Protein konsentrasjon, samt protein- og RNA-profil av fraksjonene viste at makromolekyler ble tilfredsstillende separert. Videre tydet både ionestyrke- og pH-målinger, samt innledende reprogrammeringsforsøk på at compatible fysiologiske betingelser var blitt etablert for reprogrammering.

### **Effekt av adherens og SLO permeabilisering på opptak av markører**

Reprogrammeringsmetoden denne mastergradsoppgaven bygger på, anvender permeabiliserte 293T celler i suspensjon<sup>68</sup>. SLO permeabilisering fører til kanaler med en diameter på 30-40 nm<sup>71</sup>, hvilket er tilstrekkelig for opptak av store makromolekyler med molekylvekt på opptil 100 KDa<sup>72</sup>. Effektiviteten av permeabilisering av plasmamembranen med SLO blir sannsynligvis påvirket av om cellene er adherente eller i suspensjon. Ved celler i suspensjon får SLO tilgang til hele celleoverflaten, mens det er kun den apikale siden som er tilgjengelig for SLO-mediert permeabilisering hos adherente celler. Om dette har en positiv eller negativ innvirkning på effektiviteten til SLO permeabiliseringen, er uklart. Dette gjorde det

nødvendig å undersøke opptak av makromolekyler for adherente 293T celler med og uten SLO permeabilisering.

Resultatene viste opptak av markørene både med og uten SLO permeabilisering.

Fluorescensen var flekkvis distribuert i cellene, i motsetning til en forventet jevn fordeling etter diffusjon gjennom SLO porer. Dette tyder på at markørene er tatt opp via endocytose og er lokalisert i endocytiske vesikler. Omtrent 10 % av cellene uten SLO behandling i forkant av ekstraktbehandlingen viste opptak av EGFP protein, i motsetning til 20 % for SLO permeabiliserte celler. Dette kan tyde på at noe av opptaket skyldes diffusjon gjennom SLO skapte porer likevel. I tillegg til reprogrammeringsforsøkene som bruker SLO for å fasilitere opptak i celler av komplekse celleekstrakter<sup>64,68</sup>, er det tidligere vist at SLO mediert permeabilisering fører til betydelig intracellulært opptak av makromolekyler<sup>72,73</sup>. Samlet tyder dette på at endocytose spilte en stor rolle i opptak av markørene, men at SLO permeabilisering eventuelt kan øke opptaket. Det er mulig at permeabilisering av adherente celler i forhold til celler i suspensjon ikke gir et like effektivt resultat siden det mest sannsynlig kun er den apikale siden som blir permeabilisert. Dette kan bidra til at forskjellen mellom permeabilisert og upermeabilisert adherente celler blir så liten som vi observerte. De to forskjellige markørene ble ikke tatt opp av like mange 293T celler etter permeabilisering med SLO. Texas Red-dextran konjugatet ble tatt opp i omtrent 50 % av cellene, mens EGFP proteinet viste opptak i omtrent 20 % av cellene. Forskjellene mellom opptak av markørene kan skyldes at en av markørene kan ha større affinitet til for eksempel ”scavenger” reseptorer enn den andre, og blir dermed mer effektivt endocyttert. En annen årsak kan skyldes ulik molekylkonformasjon av markørene. Studier har vist at SLO permeabilisering ikke ukritisk fører til diffusjon av molekyler selv om de er under en viss størrelse<sup>73</sup>.

Det er vist at celleadhesjon spiller en viktig rolle i å regulere cellulære prosesser som proliferering, migrering, differensiering, overlevelse<sup>74</sup> og endocytose<sup>75,76</sup>. Forskjell mellom endocytoseraten i adherente- og suspenderte celler er vist i flere studier. Endotelceller i multicellulære aggregater øker raten av pinocytisk opptak i forhold til adherente endotelceller<sup>75</sup>. *In vitro* forsøk utført med alveolære makrofager fra hund, viser at makrofager inkubert i suspensjon tar opp 2-5 ganger flere partikler enn adherente makrofager, og antyder at dette kan komme av at makrofager i suspensjon er nærmere *in vivo* forholdene i lungene<sup>76</sup>. Samlet kan dette tyde på at celler i suspensjon endocyterer mer effektivt enn adherente celler. Alternativt kan det tyde på at endocytoseraten øker når forhold er nært opp til de *in vivo*. En reprogrammering med adherente 293T celler vil være nærmere epitelcellelinjens fysiologiske betingelser *in vivo*. Vesikler og lysosomer til mange *in vivo* epitelceller, til eksempel i nyrene<sup>77,78</sup>, er hele tiden fylt med pinocytiske markører, noe som antyder at de endocyterer kontinuerlig. Dette argumenterer for at adhesjon vil føre til en økt endocytose ved en overgang fra celler i suspensjon til adherente 293T celler. Samlet viser dette viktigheten av å undersøke eventuelle forskjeller mellom reprogrammering av suspenderte eller adherente celler.

Adhesjon til poly-L-lysin og plast er forskjellig, så det er rimelig å anta at også dette påvirker endocytose. Det er vist at partikler dekket med poly-L-lysin induserer høy fagocytisk aktivitet både hos dendrittske celler og makrofager<sup>79</sup>. En annen studie viser at tilsetning av poly-L-lysin førte til en markert stimulering av væskefase pinocytose hos U-937 monocytter<sup>80</sup>. Dette tyder på at poly-L-lysin fører til økt endocytisk aktivitet, men hva dette skyldes, og om en liknende effekt oppnås ved kultivering på poly-L-lysin, er usikkert. Reseptormediert endocytose i clathrin-belagte vesikler står for opptak av spesifikke komponenter i den ekstracellulære væsken, men det er lite sannsynlig at 293T celler har spesifikke reseptorer for Texas Red-dextran konjugatet eller EGFP. Hovedopptaket av

markørene kan antageligvis ikke tilskrives reseptormediert endocytose, men det er en mulighet for at uspesifikk binding til overflaten kan ha bidratt til opptak. Clathrin-belagte vesikler står i tillegg til reseptormediert endocytose, for en stor del av væskefase endocytosen i en celle. Det er vist for fibroblaster i kultur at omtrent 2500 clathrin-belagte vesikler avsnøres av plasmamembranen hvert minutt uavhengig om reseptorer (med eller uten ligand) er til stede eller ikke. Væskefase endocytose skjer også via kaveolaer (latin; lite hulrom) som finnes i plasmamembranen til de fleste celletyper. Flere ligander er vist å bli internalisert via kaveolae, blant annet serum albumin<sup>81</sup> og Glycosylfosfatidylinositol (GPI)-ankret GFP<sup>82</sup>. Endocytoseraten støtter at det både er mulig, og mest sannsynlig at markørene er tatt opp ved væskefase endocytose.

Det er vist med dette at markører blir tatt opp i adherente celler, og at opptaket ser ut til å være mer eller mindre uavhengig av SLO. Dette viser at en multibrønnplate plattform, med eller uten SLO, mest sannsynligvis er kompatibel med reprogrammering.

## **Effekt av adhesens og SLO permeabilisering på reprogrammering**

Antallet celler som viste opptak av markørene, både med og uten SLO, lå på 10-20 % for EGFP protein og på ~50 % for Texas Red-dextran konjugat. Om dette er indikativt for et tilsvarende opptak av reprogrammeringsfaktorer, er usikkert. Disse kan være forskjellige DNA-, RNA- eller proteinmolekyler, som i større eller mindre grad enn markørene blir tatt opp i cellene.

For å videre undersøke om multibrønnplate plattformen var kompatibel med reprogrammering ble det utført ett reprogrammeringsforsøk med adherente 293T celler inkubert med ufraksjonert NCCIT celleekstrakt. Reprogrammeringsmetoden denne mastergradsoppgaven bygger på, anvender et NCCIT celleekstrakt til å reprogrammere permeabiliserte 293T celler i suspensjon<sup>68</sup>. Med denne reprogrammeringsmetoden er det vist at et målcellespesifikt, om enn ikke helt komplett transkripsjonelt program, er etablert<sup>68</sup>. Noen, men ikke alle de



transkripsjonelle endringene er vist å være stabile, hvilket tyder på at reprogrammeringen nødvendigvis ikke er fullstendig<sup>68</sup>. Flertallet av de oppregulerte genene ble vist å være spesifikke for NCCIT celler, og koder for proteiner som er karakteristiske for stamceller, som til eksempel Oct4<sup>68</sup>. Transkripsjonelle markører for ”multilineage” differensieringspotensiale ble også påvist<sup>68</sup>. Homeodomene proteinet Oct4 er vist å bli oppregulert i ekstraktbehandlede 293T celler til et nivå som likner på det i NCCIT celler<sup>68</sup> og blir kontinuerlig uttrykt i ES celler for å vedlikeholde pluripotens. Oct4 virker ved å binde til et sett av målgener som inkluderer *SOX2*<sup>83</sup>, *UTF1*<sup>84,85</sup>, *REX1*<sup>86</sup>, *FGF4*<sup>87</sup> og *OPN*<sup>88</sup>. I tillegg til *OCT4*, ble ett av disse genene; *REX1* undersøkt i denne oppgaven. Videre ble det undersøkt for nedregulering av *LMNA*, en markør for terminert differensierte celler<sup>89</sup>, som er vist å bli kraftig nedregulert to uker etter NCCIT ekstraktbehandling<sup>68</sup>. Forventet resultat var at reprogrammeringsforsøket skulle vise oppregulering av *OCT4* og *REX1*, samt nedregulering av *LMNA* som vist av Taranger *et al.*<sup>68</sup>. Morfologi og genekspresjon ble analysert henholdsvis en og to uker etter ekstraktbehandlingen. Kun en av disse SLO konsentrasjonene; 100 ng/ml SLO, viste i tillegg en betydelig oppregulering av *REX1* i forhold til ubehandlede 293T celler. En opp- eller nedregulering på mer enn 3 regnes generelt for å være betydelig. Analysene fra reprogrammeringen viste at cellene permeabilisert med SLO i forkant av inkubering i NCCIT ekstrakt, dannet kolonier med definerte kanter som likner på NCCIT kolonier. Det ble ikke observert morfologiske endringer i 293T celler som ikke var permeabilisert med SLO i forkant av inkubering i NCCIT celleekstrakt, men de viste oppregulering av *REX1*. Ingen av prøvene viste betydelig nedregulering av *LMNA*. Se figur 11 og 12.

Samlet viser dette at reprogrammeringen var i bestefall ufullstendig.

Resultatene tyder likevel på at det er mulig å endre genekspresjon til adherente celler. Dette er også vist ved en reprogrammering av både upermeabiliserte og permeabiliserte 293T celler

festet til poly-L-lysin behandlede dekkglass, utført med et Jurkat T-celleekstrakt<sup>64,90</sup>. Dette viser at multibrønnplaten er kompatibel med reprogrammering.

Resultatene kan videre tyde på at SLO ikke er nødvendig for reprogrammering, og som en konsekvens av dette, heller ikke endrer genekspressjon i seg selv. Flere studier har vist at reprogrammering er mulig selv uten permeabilisering av cellene i forkant av inkubering med ekstraktet. Aktivisering av *Oct4* transkripsjon i 293T celler i *Xenopus* egg ekstrakt skjer uavhengig av SLO permeabilisering, selv om det er en svak økt induksjon av transkripsjon i permeabiliserte versus upermeabiliserte celler<sup>67</sup>. På samme måte er det vist at både permeabiliserte og upermeabiliserte fettstamceller inkubert i rotte cardiomyocyt-ekstrakt uttrykker cardiomyocyt markører<sup>60</sup>. Dette kan tyde på at reprogrammering på lik linje med opptak av markørene, blir mediert av mekanismer som virker uavhengig av permeabilisering. I tillegg til endocytose kan en slik mekanisme inkludere binding av signalmolekyler i ekstraktet til overflatereseptorer i donorcellen, som videre kan initiere signalisering via reaksjonsveier som vanligvis ikke er aktive. En reseptormediert mekanisme er antatt å føre til aktivisering av dedifferensierings markører slik at pattedyr myotuber dedifferensierer etter inkubering i blastema ekstrakt<sup>66</sup>. Samlet tyder dette på at bruken av upermeabiliserte celler er kompatibel med reprogrammering.

De morfologiske endringene som ble observert i cellene permeabilisert med 200 ng/ml SLO, kan skyldes kombinasjonen av SLO og NCCIT ekstrakt siden ingen av faktorene alene fører til morfologiske endringer. Alternativt er det mulig at andre markører enn de vi har undersøkt er opp- eller nedregulert i de ekstraktbehandlede cellene, slik at de morfologiske endringene er et tegn på reprogrammering mot en pluripotent tilstand som antydnet av Taranger *et al.* *NANOG* er sammen med *OCT4*, også sentral i vedlikeholdelse av en pluripotent tilstand<sup>16,17</sup>, og det er mulig at dette er oppregulert i de NCCIT ekstraktbehandlede cellene. En annen markør for dedifferensiering i 293T celler er nedregulering av et 293T celledoespesifikt gen; nyre

”natriuretic” *peptid reseptor C (NPR3)*. En annen variant av *NPR*, nemlig *NPRA (NPR1)* genet), blir nedregulert i 293T celler inkubert med *Xenopus* egg<sup>67</sup>. Det er kun spekulasjoner om hvorvidt uttrykket av disse genene er endret i de ekstraktbehandlede cellene og bør undersøkes i videre studier. Resultatene tyder på at endringene som er induisert av NCCIT ekstraktet på langt nær er så omfattende som beskrevet av Taranger *et al.* Hva dette kan skyldes er usikkert, men av ukjente årsaker varierer graden av reprogrammering fra forsøk til forsøk.

Dette reprogrammeringsforsøket indikerer at det er mulig å indusere endringer i genekspressjonen til adherente 293T celler inkubert i NCCIT celleekstrakt uavhengig av SLO permeabilisering.

## **Fraksjonering av ekstraktet**

Fraksjoneringen av ekstrakt ble utført for å etablere en metode for identifikasjon av nødvendige og tilstrekkelige komponenter for reprogrammering. Det var viktig at fraksjoneringsmetoden ikke førte til ufysiologiske betingelser for cellene under behandling med ekstraktfraksjonene. Det valgte fraksjoneringsmediet, Nycodenz, ble i hovedsak valgt på grunn av lav toksisitet i forhold til celler<sup>91,92</sup>, at den ikke blir metabolisert av celler og ikke utøver noen statistisk signifikant effekt på morfologi eller vekstrate<sup>93</sup>. Ionestyrke- og pH-målingene viste at fraksjonene sannsynligvis ikke vil føre til ufysiologiske betingelser. Innledende reprogrammeringsforsøk som ble utført med celler i suspensjon, både med fraksjonert og ufraksjonert ekstrakt, viste ingen morfologiske endringer eller ytre tegn på ufysiologiske betingelser av Nycodenz på de ekstraktbehandlede cellene (data ikke vist). Resultatene fra tetthetsmålingene viste at betingelsene for generering av gradienten var etablert. En lengre sentrifugeringstid ville resultere i en brattere, men ikke nødvendigvis lineær kurve. Den valgte sentrifugeringstiden viste seg å generere en gradient som var tilstrekkelig for separering av ekstraktkomponenter noe som ble vist ved protein

konsentrasjonsmålinger, SDS-PAGE og agrose gel. Det er lite sannsynlig at RNA alene fører til en omfattende reprogrammering<sup>68</sup>, men en rolle for RNA i regulering av spesifikke gener, eventuelt sammen med proteiner for initiering av reprogrammering gjenstår å bli undersøkt. Resultatene viser at ekstraktet er fraksjonert slik at ekstraktkomponentene er separert på en tilfredsstillende måte. Det er fortsatt uvisst om ekstraktet har beholdt sin biologiske aktivitet etter fraksjoneringen, det vil bare fremtidige reprogrammeringsforsøk vise. Det er også usikkert om det vil være mulig å finne reprogrammeringsaktivitet i en eller flere av fraksjonene, eller om sammenslåing av flere gir reprogrammeringsaktivitet. Dette arbeidet gjenstår å utføre.

Det er mange muligheter for videre variasjoner med denne metoden for fraksjonering av ekstrakt. Det er mulig å RNase og/eller DNase behandle fraksjonene før reprogrammering, slik at det kan testes om nukleinsyrene bidrar til reprogrammering. Fraksjoneringsmetoden kan kombineres med kompatible kjerne- og cytosol-isolerings prosedyrer slik at man på en mer målrettet måte kan begynne å identifisere tilstrekkelige og nødvendige komponenter i ekstrakt som fører til reprogrammering.

## **Konklusjon**

Jeg har med denne mastergradsoppgaven etablert en eksperimentell plattform for identifisering av nødvendige og tilstrekkelige komponenter i teratocarcinoma NCCIT celleekstrakt for reprogrammering av 293T celler. Jeg har oppnådd dette ved å etablere en multibrønnplate plattform som egner seg til reprogrammering av adherente celler. Videre har jeg etablert en fraksjoneringsmetode for å separere makromolekyler i nativ tilstand som utifra preliminare eksperimenter er kompatibel med reprogrammering av celler.

## Reference List

1. Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 245-254 (2003).
2. Antequera, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 1647-1658 (2003).
3. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21 (2002).
4. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45 (2000).
5. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).
6. Boquest, A. C. *et al.* Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1131-1141 (2005).
7. Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211-228 (2001).
8. Zuk, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279-4295 (2002).
9. Doss, M. X., Koehler, C. I., Gissel, C., Hescheler, J. & Sachinidis, A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J. Cell Mol. Med.* **8**, 465-473 (2004).
10. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**, 7634-7638 (1981).
11. Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. & Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* **18**, 399-404 (2000).
12. Pera, M. F., Reubinoff, B. & Trounson, A. Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **113 ( Pt 1)**, 5-10 (2000).
13. Andrews, P. W. Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS* **106**, 158-167 (1998).
14. Przyborski, S. A. Isolation of human embryonal carcinoma stem cells by immunomagnetic sorting. *Stem Cells* **19**, 500-504 (2001).

15. Flaszka, M. *et al.* Reprogramming in inter-species embryonal carcinoma-somatic cell hybrids induces expression of pluripotency and differentiation markers. *Cloning Stem Cells* **5**, 339-354 (2003).
16. Przyborski, S. A., Christie, V. B., Hayman, M. W., Stewart, R. & Horrocks, G. M. Human embryonal carcinoma stem cells: models of embryonic development in humans. *Stem Cells Dev.* **13**, 400-408 (2004).
17. Sperger, J. M. *et al.* Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 13350-13355 (2003).
18. Rosner, M. H. *et al.* A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* **345**, 686-692 (1990).
19. Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, A. G. & Miyazaki, J. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **22**, 1526-1536 (2002).
20. Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. & Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* **12**, 2048-2060 (1998).
21. Chambers, I. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655 (2003).
22. Mitsui, K. *et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631-642 (2003).
23. Hanna, L. A., Foreman, R. K., Tarasenko, I. A., Kessler, D. S. & Labosky, P. A. Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Dev.* **16**, 2650-2661 (2002).
24. Damjanov, I., Horvat, B. & Gibas, Z. Retinoic acid-induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT. *Lab Invest* **68**, 220-232 (1993).
25. Teshima, S. *et al.* Four new human germ cell tumor cell lines. *Lab Invest* **59**, 328-336 (1988).
26. Soll, D. R. & Waddell, D. R. Morphogenesis in the slime mold Dictyostelium discoideum. 1. The accumulation and erasure of "morphogenetic information". *Dev. Biol.* **47**, 292-302 (1975).
27. Takeuchi, I. & Sakai, Y. Dedifferentiation of the disaggregated slug cell of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *Dev. Growth Differ.* **13**, 201-210 (1971).
28. Slack, J. M. & Tosh, D. Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 581-586 (2001).

- 
29. Tosh, D. & Slack, J. M. How cells change their phenotype. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 187-194 (2002).
  30. Morgan, T. H. *Regeneration*. New York: Macmillan Company, (1901).
  31. Carlson, B. M. Some principles of regeneration in mammalian systems. *Anat. Rec. B New Anat.* **287**, 4-13 (2005).
  32. Heber-Katz, E. The regenerating mouse ear. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 415-419 (1999).
  33. Heber-Katz, E., Leferovich, J. M., Bedelbaeva, K. & Gourevitch, D. Spallanzani's mouse: a model of restoration and regeneration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **280**, 165-189 (2004).
  34. Clark, L. D., Clark, R. K. & Heber-Katz, E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **88**, 35-45 (1998).
  35. Leferovich, J. M. *et al.* Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 9830-9835 (2001).
  36. Tsonis, P. A. Regeneration in vertebrates. *Dev. Biol.* **221**, 273-284 (2000).
  37. Rao, M. S. *et al.* Almost total conversion of pancreas to liver in the adult rat: a reliable model to study transdifferentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 131-136 (1988).
  38. Rao, M. S. *et al.* Role of periductal and ductular epithelial cells of the adult rat pancreas in pancreatic hepatocyte lineage. A change in the differentiation commitment. *Am. J. Pathol.* **134**, 1069-1086 (1989).
  39. Reddy, J. K., Rao, M. S., Yeldandi, A. V., Tan, X. D. & Dwivedi, R. S. Pancreatic hepatocytes. An in vivo model for cell lineage in pancreas of adult rat. *Dig. Dis. Sci.* **36**, 502-509 (1991).
  40. GURDON, J. B. Nuclear transplantation and the analysis of gene activity in early amphibian development. *Adv. Exp. Med. Biol.* **62**, 35-44 (1975).
  41. GURDON, J. B., Partington, G. A. & De Robertis, E. M. Injected nuclei in frog oocytes: RNA synthesis and protein exchange. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **36**, 541-553 (1976).
  42. De Robertis, E. M. & GURDON, J. B. Gene activation in somatic nuclei after injection into amphibian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 2470-2474 (1977).
  43. Byrne, J. A., Simonsson, S., Western, P. S. & GURDON, J. B. Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes. *Curr. Biol.* **13**, 1206-1213 (2003).
  44. Simonsson, S. & Gurdon, J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat. Cell Biol.* **6**, 984-990 (2004).

- 
45. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. **385**, 810-813 (1997).
  46. Chesne, P. *et al.* Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 366-369 (2002).
  47. Shin, T. *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* **415**, 859 (2002).
  48. Cibelli, J. B. *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. **280**, 1256-1258 (1998).
  49. Munsie, M. J. *et al.* Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr. Biol.* **10**, 989-992 (2000).
  50. Wakayama, T. & Yanagimachi, R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol. Reprod. Dev.* **58**, 376-383 (2001).
  51. Cibelli, J. B., Campbell, K. H., Seidel, G. E., West, M. D. & Lanza, R. P. The health profile of cloned animals. *Nat. Biotechnol.* **20**, 13-14 (2002).
  52. Jeanisch, R., Eggan, K., Humpherys, D., Rideout, W. & Hochedlinger, K. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning Stem Cells* **4**, 389-396 (2002).
  53. Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S. C. & Surani, M. A. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J.* **16**, 6510-6520 (1997).
  54. Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N. & Tada, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* **11**, 1553-1558 (2001).
  55. Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. & Smith, A. G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416**, 545-548 (2002).
  56. Terada, N. *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-545 (2002).
  57. Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. & Eggan, K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* **309**, 1369-1373 (2005).
  58. Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N. & Tada, T. Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol. Cell Biol.* **24**, 5710-5720 (2004).
  59. Collas, P. & Hakelien, A. M. Teaching cells new tricks. *Trends Biotechnol.* **21**, 354-361 (2003).
  60. Gaustad, K. G., Boquest, A. C., Anderson, B. E., Gerdes, A. M. & Collas, P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 420-427 (2004).



- 
61. Qin, M., Tai, G., Collas, P., Polak, J. M. & Bishop, A. E. Cell extract-derived differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**, 712-718 (2005).
  62. Landsverk, H. B. *et al.* Reprogrammed gene expression in a somatic cell-free extract. *EMBO Rep.* **3**, 384-389 (2002).
  63. Hakelien, A. M. *et al.* Long-term in vitro, cell-type-specific genome-wide reprogramming of gene expression. *Exp. Cell Res.* **309**, 32-47 (2005).
  64. Hakelien, A. M., Landsverk, H. B., Robl, J. M., Skalhegg, B. S. & Collas, P. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat. Biotechnol.* **20**, 460-466 (2002).
  65. Hakelien, A. M., Gaustad, K. G. & Collas, P. Transient alteration of cell fate using a nuclear and cytoplasmic extract of an insulinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 834-841 (2004).
  66. McGann, C. J., Odelberg, S. J. & Keating, M. T. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13699-13704 (2001).
  67. Hansis, C., Barreto, G., Maltry, N. & Niehrs, C. Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. *Curr. Biol.* **14**, 1475-1480 (2004).
  68. Taranger, C. K. *et al.* Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell.* **16**, 5719-5735 (2005).
  69. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
  70. Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. & Moorman, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**, 62-66 (2003).
  71. Bhakdi, S. *et al.* Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch. Microbiol.* **165**, 73-79 (1996).
  72. Walev, I. *et al.* Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 3185-3190 (2001).
  73. Fawcett, J. M., Harrison, S. M. & Orchard, C. H. A method for reversible permeabilization of isolated rat ventricular myocytes. *Exp. Physiol* **83**, 293-303 (1998).
  74. Giancotti, F. G. & Ruoslahti, E. Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-1032 (1999).

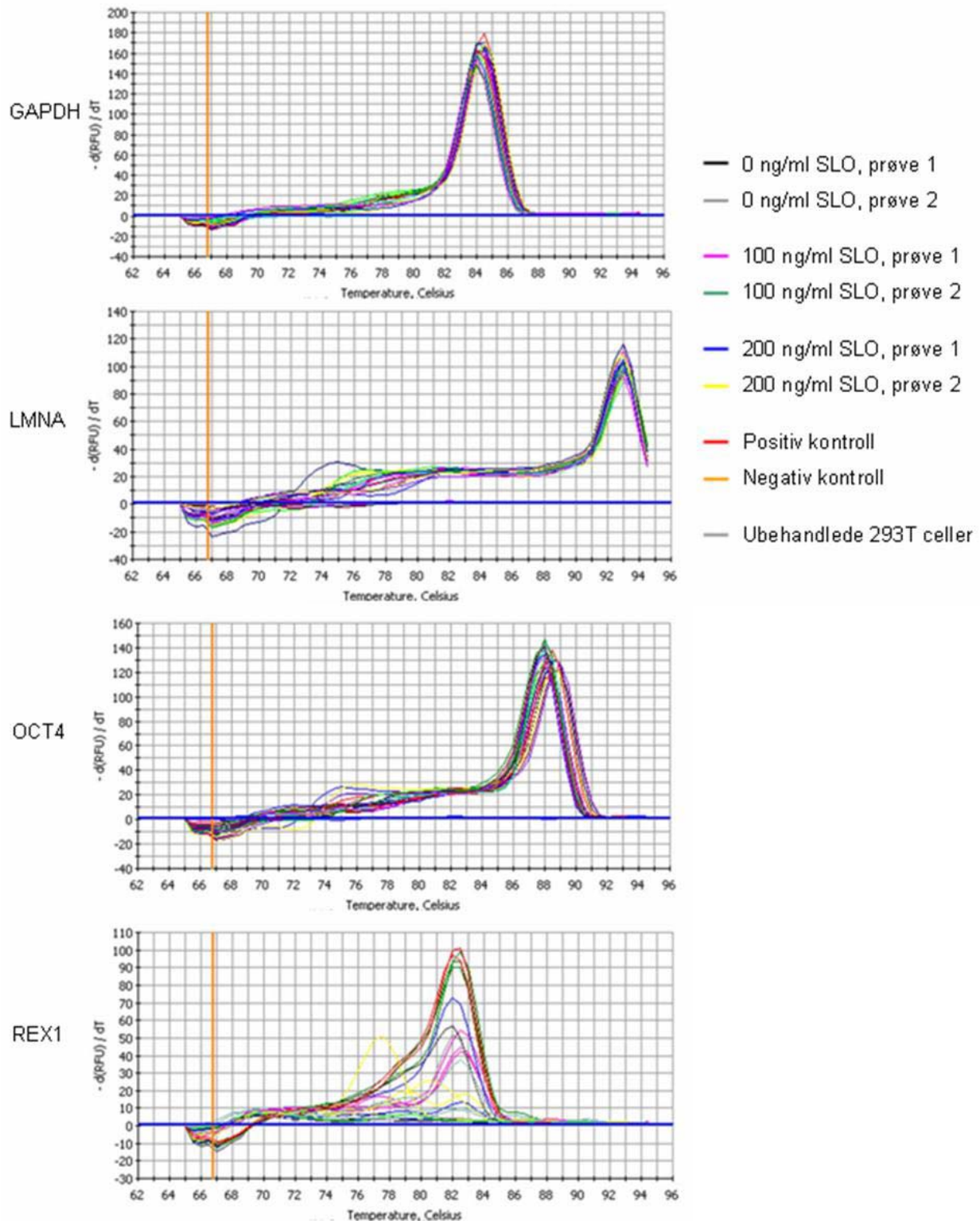
- 
75. Catizone, A. *et al.* Non-specific pinocytosis by human endothelial cells cultured as multicellular aggregates: uptake of lucifer yellow and horse radish peroxidase. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* **42**, 1229-1242 (1996).
  76. Mueller, H. L., Guilmette, R. A. & Muggenburg, B. A. Uptake of inert particles by dog alveolar macrophages in vitro--a comparison of monolayer and suspension techniques. *J. Appl. Toxicol.* **9**, 135-143 (1989).
  77. Graham, R. C., Jr. & Karnovsky, M. J. Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxidases as protein tracers. *J. Exp. Med.* **124**, 1123-1134 (1966).
  78. STRAUS, W. CYTOCHEMICAL OBSERVATIONS ON THE RELATIONSHIP BETWEEN LYSOSOMES AND PHAGOSOMES IN KIDNEY AND LIVER BY COMBINED STAINING FOR ACID PHOSPHATASE AND INTRAVENOUSLY INJECTED HORSERADISH PEROXIDASE. *J. Cell Biol.* **20**, 497-507 (1964).
  79. Thiele, L. *et al.* Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J. Control Release* **76**, 59-71 (2001).
  80. Oefelein, M. G., Arsenis, G. & Livingston, J. N. Insulin-stimulated fluid-phase pinocytosis and internalization of the insulin receptor: differences between the U-937 monocyte and rat adipocyte. *Metabolism* **35**, 818-823 (1986).
  81. Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E. & Allard, J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* **127**, 1217-1232 (1994).
  82. Nichols, B. J. *et al.* Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.* **153**, 529-541 (2001).
  83. Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* **17**, 126-140 (2003).
  84. Nishimoto, M. *et al.* The embryonic Octamer factor 3/4 displays distinct DNA binding specificity from those of other Octamer factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 581-586 (2003).
  85. Okuda, A. *et al.* UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J.* **17**, 2019-2032 (1998).
  86. Hosler, B. A., LaRosa, G. J., Grippo, J. F. & Gudas, L. J. Expression of REX-1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* **9**, 5623-5629 (1989).
  87. Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C. & Dailey, L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* **9**, 2635-2645 (1995).

88. Botquin, V. *et al.* New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* **12**, 2073-2090 (1998).
89. Hutchison, C. J. & Worman, H. J. A-type lamins: guardians of the soma? *Nat. Cell Biol.* **6**, 1062-1067 (2004).
90. Häkelien, A. M. Modulation of somatic cell gene expression *in vitro*, -towards altering cell fate. 2004.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
91. Mutzel, W. & Speck, U. Pharmacokinetics and biotransformation of iohexol in the rat and the dog. *Acta Radiol. Suppl* **362**, 87-92 (1980).
92. Salvesen, S. Acute intravenous toxicity of iohexol in the mouse and in the rat. *Acta Radiol. Suppl* **362**, 73-75 (1980).
93. Ford, T. C. & Rickwood, D. Formation of isotonic Nycodenz gradients for cell separations. *Anal. Biochem.* **124**, 293-298 (1982).

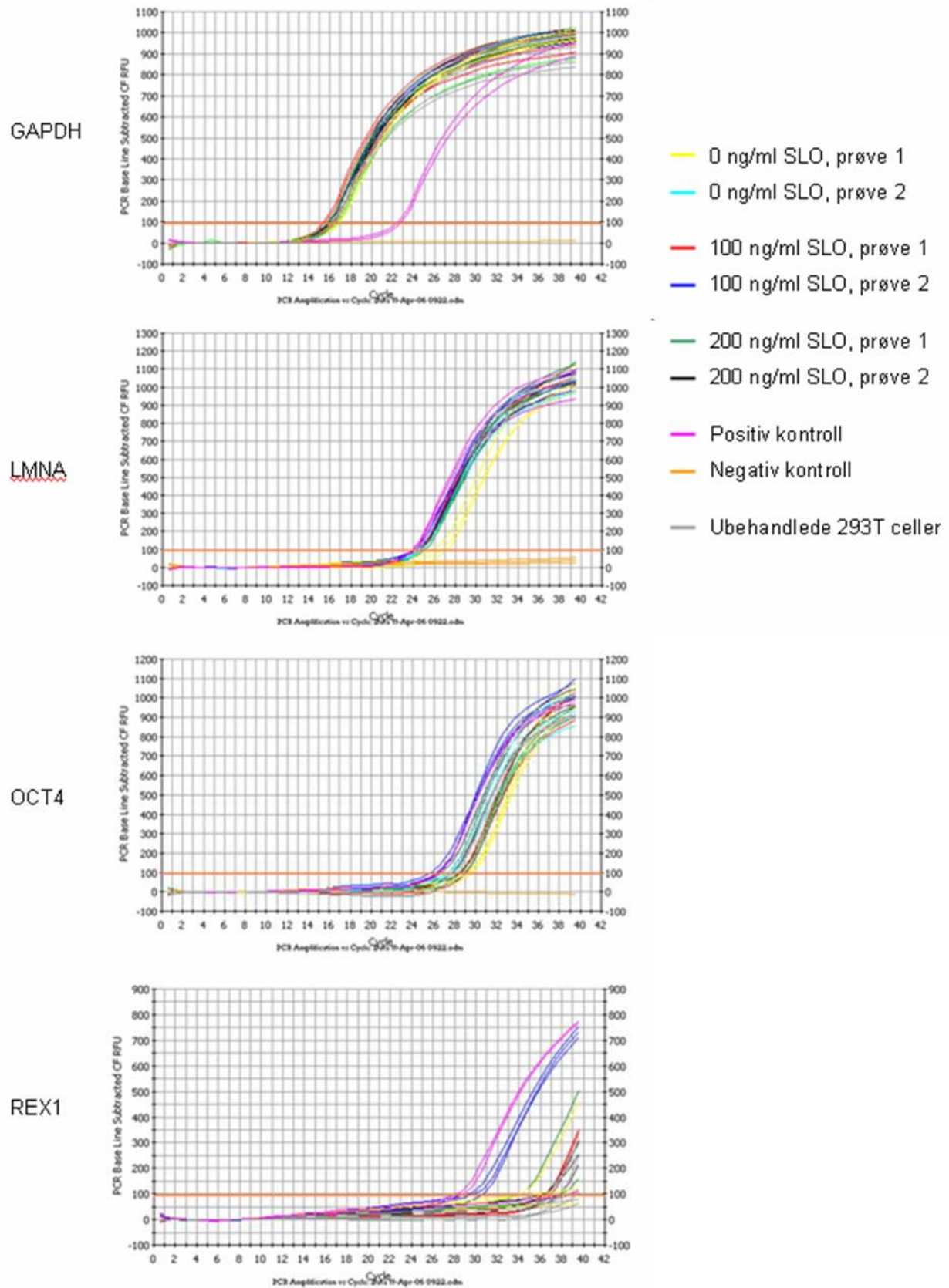
## **SUPPLERENDE TABELL OG FIGURER**

**Supplerende tabell 1.** Transkript-spesifikke primersekvenser brukt i kvantitativ RT-PCR

<b>Gen navn</b>	<b>Primer sekvens</b>
<b>GAPDH</b>	F: 5'-TCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' R: 5'-TTGCCATGGGTGGAATCATA-3'
<b>OCT4</b>	F: 5'-AAGCGATCAAGCAGCGACTAT-3' R: 5'-GGAAAGGGACGAGGAGTACA-3'
<b>LAMIN A</b>	F: 5'-CTGTGGTTGAGGACGACGAG-3' R: 5'-TGCGGTAGCTGCGAGTGA-3'
<b>REX 1</b>	F: 5'-CAGAACAGAAGAGGCCTTCAC-3' R: 5'-TCTGAGTAAGCTGTCTTCAGCAA-3'



**Supplerende figur S1. Smeltekurver til kvantitativ RT-PCR produkter.** Hver farge representerer en trippelt i den eksperimentelle platen, bortsett fra én negativ kontroll og to positive kontroller (LMNA primer har tre negative kontroller).



**Supplerende figur S2. PCR kvantifiseringskurve fra Q RT-PCR analyser.** Hver farge representerer en tripplett i den eksperimentelle platen, bortsett fra én negativ kontroll og to positive kontroller (LMNA primer har tre negative kontroller).